

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
Keemia instituut

Joana Jõgela
**MUDELAINETE SÜNTEES FÖRSTERI DISTANTSI UURIMISEKS
ARC-LUM(FLUO) SONDIDES**
Bakalaureusetöö

Juhendajad: teadur Erki Enkvist, PhD
Jürgen Vahter, MSc

Tartu, 2015

Sisukord

Lühendid.....	4
1 Sissejuhatus	5
2 Kirjanduse ülevaade	7
2.1 Fotoluminestsents	7
2.1.1 Fluorestsents ja fosforestsents	7
2.2 Försteri resonantsenergia ülekanne	8
2.2.1 Viivitusajaga luminesstsents/FRET	10
2.3 Fosforestsents toatemperatuuril	10
2.3.1 Hapniku kustutav toime luminesstentssignaalile	11
2.3.2 Erinevad maatriksid.....	11
2.3.3 ARC-Lum ja ARC-Lum(Fluo) sondid	12
2.4 Proteiinkinaasid	13
2.4.1 cAMP-sõltuv proteiinkinaas.....	14
2.5 Inhibiitorid	15
2.6 Tahkefaassüntees	15
2.6.1 Kaitserühmad	16
3 Kasutatud aparatuur ja meetodid	17
3.1 Kasutatud reagentid, aparatuur ja vahendid.....	17
3.2 ARC-ide süntees	17
3.2.1 Kaiseri test.....	19
3.3 ARC-ide kontsentratsiooni määramine	19
3.4 ARC-Lum(Fluo) sondide uurimine	19
3.4.1 ARC-ide komplekseerumine PKAc-ga	20
3.4.2 ARC-ide komplekseerumine β -tsüklodekstriiniga	20
3.4.3 ARC-id PVA-s	20

3.4.4	Singlett-singlett FRET-i uurimine ARC-Lum(Fluo) sondides.....	21
3.4.5	ARC-id agarosis	21
4	Tulemused ja arutelu	22
4.1	Sünteesitud ARC-id.....	22
4.2	ARC-Lum(Fluo) sondide luminesentssignaali eluea määramine	23
4.2.1	ARC-ide komplekseerumine PKAc-ga	23
4.2.2	ARC-ide ja β -tsüklodekstriini kompleks.....	26
4.2.3	ARC-id PVA-s	27
4.2.4	ARC-id agarosis	31
5	Kokkuvõte	33
6	Summary	35
7	Kasutatud kirjandus.....	37
8	Lisad	40

Lühendid

Lühend	Eestikeelne vaste
5-TAMRA	5-karboksütetrametüülrhodamiin
AEAA-AEAA	8-amino-3,6-dioksoktaanhape dimeer
AMTH	5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhape
ARC	adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat
ARC-Lum(Fluo)	adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat, millel on luminesentsomadused
ATP	adenosiin-5'-trifosfaat
Boc	tert-butüüloksükarbonüül
BSA	veiseseerumi albumiin
cAMP	tsükliline adenosin-3',5'-monofosfaat
DAP	2,3-diaminopropaanhape
DCE	1,2-dikloroetaan
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
Dpr	2,3-diaminopropaanhape
DTT	ditiotreitool
EM	emissiooni lainepikkus (nm)
EX	ergastuse lainepikkus (nm)
Fmoc	9-fluorenüülmetoksükarbonüül
FRET	Försteri resonantsenergia ülekanne
HBTU	O-bensotriasool-N,N,N',N'-tetrametüül-uroonium-heksafluorofosfaat
HEPES	(4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
HPLC	kõrgefektiivne-vedelikkromatograafia
ivDde	1-(4,4-dimetüül-2,6-dioksotsükloheks-1-ülideen)-3-metüülbutüül
LC	vedelikkromatograafia
NMM	N-metüülmorfoliin
PIP	piperasiin
PK	proteiinkinaas
PKA	cAMP-sõltuv proteiinkinaas; proteiinkinaas A
PKAc	PKA katalüütiline alaühik
PKAr	PKA regulatoorne alaühik
PVA	polüvinüülalkohol
SPPS	tahkefaasi peptidisüntees
TFA	trifluoroäädikhape
TIPS	triisopropüülsilaan

1 Sissejuhatus

Fotoluminestsents on optiline nähtus, mille korral toimub valguskiirguse emiteerimine ainet, mis on ergastunud footoni absorptsioonil. Footoni absorptsioon toob kaasa luminofoori valentsielektroni ergastumise kõrgemale energiatasemele. Ergastatud olekus on luminofoori elektronspinn singletses olekus ehk ergastatud spinni ja põhiolekusse jääva spinni suunad on vastupidised. Singletsest olekust võib kiirguda fluorestsentskiirgust või toimuda intersüsteemne üleminek tripletsele olekule, mille käigus elektronspinn vahetab oma suunda ning on samasuunaline põhiolekusse jääva spinni suhtes. Ergastatud tripletsest olekust toimub kiirgumine energia põhiniivoole fosforestsentskiirgusena. Seda kiirgumist on kvantmehaanika reeglite kohaselt üldiselt keelatud, kuid mõningatel juhtudel siiski lubatud ning realiseeruv üleminek. Keelatusel tingituna on antud üleminek aeglane ning ka relakseerumisel emiteeritav luminestsentskiirguse eluiga on palju pikem. Lisaks singletsest või tripletsest olekust kiirgumisele energia põhiniivoole, võib ergastatud olekust toimuda ka energia ülekande teisele luminofoorile. Kui luminofooride vahed kaugus jääb umbes 1,5 kuni 6 nm vahele on tegemist tõenäoliselt Försteri tüüpi resonantsenergia üleminekuga (FRET-iga), mis on mittekiirguslik ülekande doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile.

ARC-Lum(Fluo) sondid koosnevad väävlit või seleeni sisaldavast aromaatses fragmendist ning fluorestsentsvärvist, mis on omavahel ühendatud peptidahelaga. Vabas olekus antud sondid pika elueaga fotoluminestsentssignaali ei kiirga, selle jaoks on vajalik sondi komplekseerumine valguga, mille tagajärjel stabiliseeritakse doonorluminofoori tripletne olek. ARC-Lum(Fluo) sondides toimub energia ülekande väävlit või seleeni sisaldavalt doonorluminofoorilt fluorestsentsvärvist aktseptorluminofoorile, põhjustades 20...2000 kordse signaali võimendumise. Samas pole üheselt eksperimentaalselt määratud, kas antud sondides toimuv energia üleminek on FRET tüüpi. Kuigi sellele viitavad paljud empiirilised tähelepanekud, on siiski antud hüpoteesis ka kahtlusi. Lisaks on märgatud, et see energia üleminek toimib suhteliselt lühikeste distantide korral (2...3 nm) [1].

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida FRET-i mehhanismi ARC-Lum(Fluo) sondides. Selleks sünteesiti ARC-Lum(Fluo) sonde, kus varieeriti doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori omavahelist distantssi. Sondides toimuva energia ülekande efektiivsuse iseloomustamiseks mõõdeti luminestsentssignaalide eluigasid. Antud parameeter valiti, seetõttu et FRET-i efektiivsus on sõltuvuses luminestsentssignaali elueast (Valem 2) ning luminestsentssignaali eluiga ei ole esimeses lähenduses sõltuv aine kontsentratsioonist. Saadud

andmete põhjal uuriti luminescentssignaali eluigade sõltuvust luminofooride vahelisest kaugusest, et saada uut informatsiooni ARC-Lum(Fluo) sondides toimuva mehhanismi kohta.

2 Kirjanduse ülevaade

2.1 Fotoluminestsents

Fotoluminestsentsiks nimetatakse elektroonselt ergastatud aine poolt emiteeritavat valguskiirgust. Footoni absorptsioonil ultraviolet- või nähtava valguse alas toimub valentsielektroni üleminek kõrgemale energiatasemele. Elektroni naasmisel põhiolekusse ehk relakseerumisel kiirgub kindla lainepikkusega valguskiirgust. Kasha reegli kohaselt toimub kiirgumine alati madalaimalt ergastatud vibratsiooniliselt energiatasemelt. Kiiratava footoni energia on madalam neelatava footoni energiast ning seda nimetatakse Stokesi nihkeks. Sellest tulenevalt on ka emiteeritava valguse lainepikkus suurem neelatud valguse lainepikkusest, kuna energia ja lainepikkus on pöördvõrdelises sõltuvuses. Vastupidine olukord on väga harv ning seda nimetatakse anti-Stokesi nihkeks.[2]

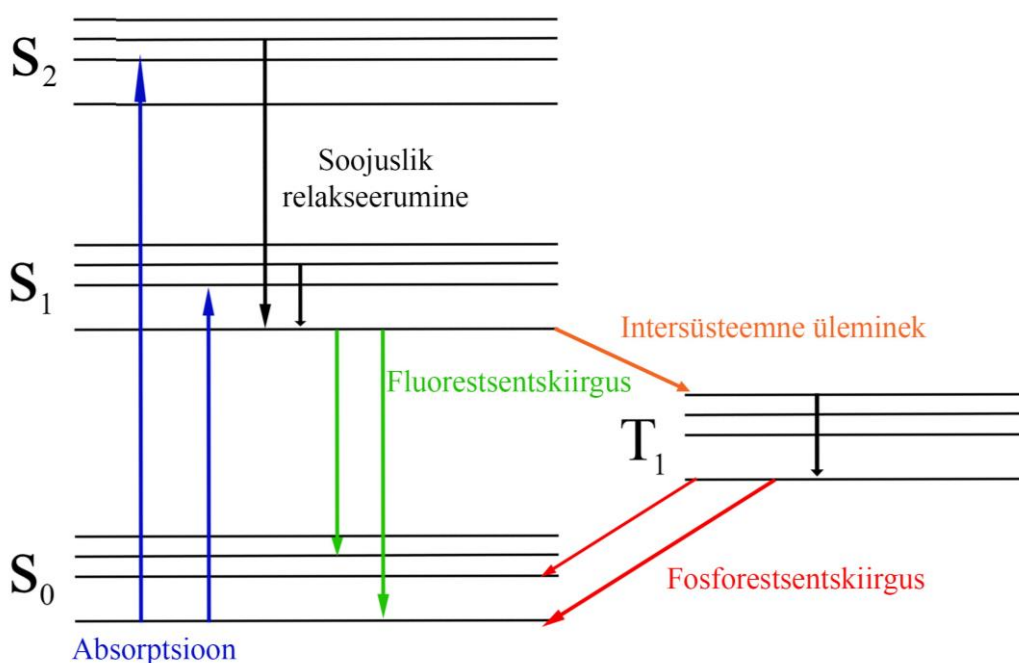
Ergastatud olekus on elektroni spinnil kaks erinevat võimalust: singletne ja tripletne olek. Singletses olekus on elektroni spinn antiparalleelne põhiolekusse jääva spinni suhtes ning ergastatud tripletises olekus paralleelne põhiolekusse jääva spinni suhtes. Lähtuvalt elektroni relakseerumisest, kas singletsest või tripletsest olekust, jaotatakse luminestsentskiirgust kaheks: fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks.[2]

2.1.1 Fluorestsents ja fosforestsents

Fluorestsents on fotoluminestsentsi liik, mille korral aatomid või molekulid ergastatakse elektromagnetkiirgusega. Osakesed relakseeruvad ergastatud singletsest olekust, kiirates footoni, mis on madalama energiaga kui ergastav footon. Konkureerivalt võib toimuda ka soojuslik relakseerumine. Emissiooni ajaline kestvus on nanosekundi skaalas. Kõige intensiivsemat fluorestsentskiirgust annavad ühendid, mis sisaldavad rohkem kui ühte aromaatsset tuuma, näiteks kinoliin.[2,3]

Valguskvandi neelamise ja kiirgumisega seotud protsesse kirjeldab Jablonski diagramm (Joonis 1). Tavatingimustel on molekul energiatasemel S_0 , kus elektronide spinnid on vastassuunalised. Neelates valguskvandi, ergastub molekul kõrgematele energiatasemete S_1 või S_2 vibratsioonilistele energianivoodele. Relakseerumine toimub seejuures kõigepealt S_1 madalaima energiaga vibratsioonilisele energianivoole ning seejärel relakseerub molekul S_0 energianivoole, kiirates samal ajal fluorestsentskiirgust. S_1 nivoolt relakseerudes on ka teine variant: molekuli elektroni spinn saab muutuda, mille tulemusena toimub üleminek singletsest olekust tripletseks ehk intersüsteemne üleminek. Tripletsest olekust S_0 energianivoole relakseerudes kiirgub fosforestsentskiirgust.[2]

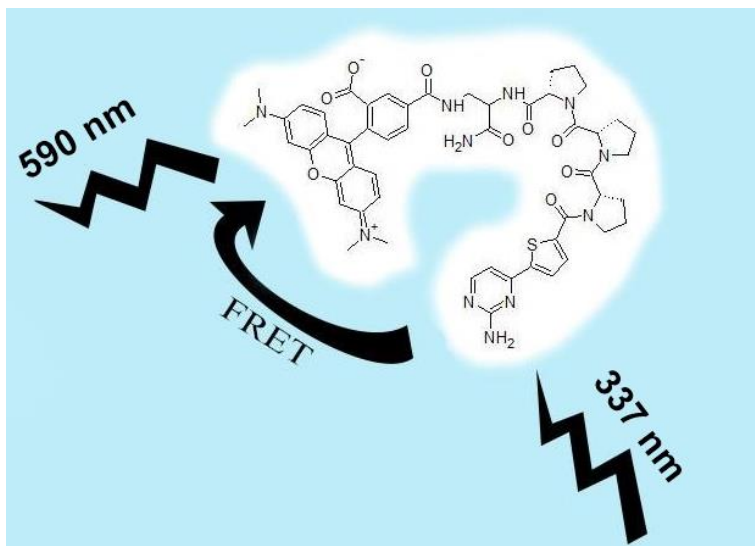
Fosforestsents erineb fluorestsentsist ajalise kestvuse poolest ja selle spekter on punasemas spektrialas. Fosforestsentsi puhul toimub eelnevalt intersüsteemne üleminek ergastatud singletsest olekust tripletse olekusse. Tripletse oleku saavutamiseks peab elektroni spinn muutuma. Kvantmehhaanika seisukohalt on tripletsest olekust kiirgumine keelatud üleminek, kuid teatud juhtudel on see osaliselt aktsepteeritav ning võib toimuda, kuid aeglaselt. Seega võrreldes fluorestsentsiga kestab fosforestsents kauem ning seda tripletsest olekust kiirgamise tõttu. Fosforestsentssignaali eluiga on enamasti mikrosekundist kuni mõne millisekundini, tahkete kehade puhul isegi sekunditest minutiteni.[2,3]



Joonis 1. Jablonski diagramm. Osakese ergastamisel toimub elektroni üleminek kõrgematele energianivoode S_1 või S_2 vibratsioonilistele alanivoodele (sinised nooled). Relakseerumine võib toimuda nii soojusliku relakseerumisena ehk sisekonversioonina (mustad nooled) kui ka footoni kiirgumisena S_1 -lt S_0 -le, mida nimetatakse fluorestsentsiks (rohelised nooled). Fosforestsentsi korral esineb intersüsteemne üleminek tripletsele energianivoole T_1 (oranž nool) ja sealt edasi relakseerumine põhiniivoole S_0 (punased nooled).

2.2 Försteri resonantsenergia ülekanne

Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET) on mittekiirguslik energia ülekanne ühelt luminofoorilt teisele. Energia ülekanne toimub doonorilt, mis on ergastatud olekus, aktseptorluminofoorile, mis saadud energia tõttu ergastub ning seejärel kiirgab kindlal lainepikkusel valguskiirgust (Joonis 2). FRET-i korral vaadeldakse luminofoori ostsilleeriva dipoolina, mis on võimeline andma energiat sarnase sagedusega võnkuvale dipoolile. Energia ülekanne toimub footoni juuresolekuta ja on dipool-dipool interaktsioonide tulemus.[4,5]



Joonis 2. FRET-i mehhanism ARC-2016 näitel. Tiofeeni fragmenti ergastub (EX) lainepikkused 337 nm, mille järel toimub energia ülekande 5-TAMRA-le, mis selle tulemusel omakorda ergastub ning relakseerudes (EM) kiirgab oranži valgust lainepikkusel 590 nm.

FRET-i ilmnemiseks peavad olema täidetud järgmised nõuded:

1. Doonor ja aktseptor peavad olema üksteisele lähedal, kuid ka mitte liiga lähedal. FRET-i teooria on hästi rakendatav, kui osakeste vaheline kaugus on umbes 1...10 nm. Kui distant luminofooride vahel on alla 1 nm toimub energia ülekande elektronide vahetuse ehk Dexteri mehhanismiga.
2. Doonori kiirgusspektri ja aktseptori neeldumisspektri vahel peab olema kattumisala. [4,6]

Försteri distantiks nimetatakse kaugust, mille korral toimub resonantsenergia ülekande 50% efektiivsusega ja see jääb tüüpiliselt vahemikku 1,5...6 nm. Teoreetiliseks Försteri distant si arvutamiseks kasutatakse valemit:

$$R_0 = 0.02108[\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} \quad (\text{Valem 1}),$$

kus R_0 tähistab Försteri distant si, n keskkonna murdumisnäitaja, Q_D doonori kvantsaagist aktseptori juuresolekuta, $J(\lambda)$ doonori ergastusspektri ja aktseptori emissioonspektri kattumisintegraali ning κ^2 aktseptori ja doonori vahelist orientatsioonifaktorit.[4]

Kui tegemist on vesilahusega, loetakse keskkonna murdumisnäitajaks bioloogiliste molekulide korral 1,4 [6]. Orientatsioonifaktor võib omada väärtusi nullist neljani, olenevalt ülemineku dipoolide asendist. Antiparalleelsete dipoolide korral $\kappa^2 = 1$, paralleelsete korral $\kappa^2 = 4$ ning risti asetsevate dipoolide $\kappa^2 = 0$. Arvutustes kasutatakse tavaliselt keskmistatud väärtust, milleks on 2/3.[4,6]

Et FRET tüüpi ülekanne oleks võimalikult efektiivne, peab doonorluminofooril olema kõrge kvantsaagis ning aktseptorluminofooril kõrge molaarne neeldumiskoeffitsient. Samuti peaks olema doonori ergastusspektril ja aktseptori neeldumisspektril võimalikult suur kattumisala. Ülekande efektiivsust kirjeldab järgmine võrrand:

$$E = \frac{k_T}{k_T + 1/\tau_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (\text{Valem 2}),$$

kus E väljendab efektiivsust, k_T energia ülekande kiiruskonstanti, τ_D ergastatud doonori eluiga aktseptori juuresolekuta ja r_{DA} doonori ja aktseptori vahelist kaugust. Efektiivsust on võimalik avaldada ka eluigade kaudu aktseptori olemasolul (τ_{DA}) ja selle puudumisel (τ_D).[4]

Energia ülekande kiiruskonstant avaldub:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0^6}{r_{DA}^6} \right) \quad (\text{Valem 3}).$$

Valemist 3 jäeldub, et FRET on tundlik juba eriti väikestele kauguste muutustele, kuna energia ülekande kiiruskonstandi sõltuvus distantist on kuuendas astmes.[4]

FRET-i põhiste analüüside suurimaks eeliseks võrreldes fluorestsentsanisotroopia meetoditega on see, et nad sõltuvad vähem keskkonnateguritest. Meetod on kõrge tundlikkusega, mistõttu on vaja väikeseid lahusekoguseid. FRET-i kasutatakse tavaliselt molekulaarkauguse hindamiseks või komplekseerumise tuvastamiseks.[4,7]

2.2.1 Viivitusajaga luminescents/FRET

Viivitusajaga luminestsentsi mõõtmist kasutatakse eelkõige ainete korral, mis on võimelised kiirgama pika elueaga luminescentskiirgust. Proov ergastatakse kindla lainepikkusega valgusega, millele järgneb ooteaeg (näiteks 50 μ s) ning seejärel toimub luminescentssignaali mõõtmine. Viivitusega luminescentssignaali mõõtmine elimineerib taustsignaale, näiteks proovide autofluorestsentsi ja valguse hajumist, seetõttu on võimalik saavutada paremat signaal-müra suhet ja tundlikkust. Viivitusega FRET-i korral kasutatakse doonoriks pika luminescentselueaga luminofoori.[5,8]

2.3 Fosforestsents toatemperatuuril

Kuna tripletsest olekust kiirgumine on aeglane, siis jõuab selle aja jooksul toimuda ka mittekiirguslikke kustumisi, mis tulenevad soojusliikumistest ja keskkonnas olevatest luminescentssignaali kustutavatest ainetest. Seetõttu on orgaaniliste ainete fosforestsents toatemperatuuril väga haruldane. Toatemperatuurine fosforestsents on omane mitmetele metallikomplekse sisaldavatele ühenditele, kus tugeva spinnorbitaalse vastasmõju tõttu on kiirgus tripletsest olekust soodsam. Orgaaniliste ühenditele pole tripletsest olekust kiirgumine väga iseloomulik, kuid seda on võimalik tekitada või soodustada. Selleks viiakse molekuli

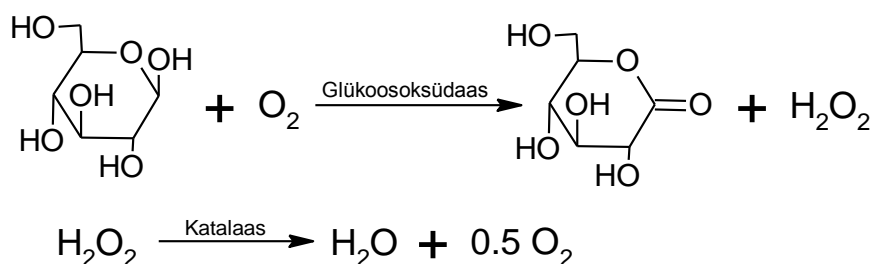
struktuuri või lisatakse lahusesse nn raskeid aatomeid (Br, I, S, Se) või neid sisaldavaid soolasisid (TlNO₃, KI). Fosforestseeruvaid metallikomplekse kasutatakse paljudes sensorites ja orgaanilistes valgusdiodides. Samas on orgaanilised ühendid, mis toatemperatuuril emiteerivad fosforestsentsi, atraktiivseks alternatiiviks metallikomplekse sisaldavatele ühenditele.[9]

Fosforestsentsi intensiivsus sõltub väga oluliselt tripletse oleku ajalisest kestvusest. Selleks, et toatemperatuuril toimuvat fosforestsentskiirgust intensiivsemaks muuta, tuleks mittekiirguslikke kustumisi minimeerida.[10]

2.3.1 Hapniku kustutav toime luminescentssignaale

Luminescentssignaali kustutajateks võivad olla orgaanilised molekulid, kompleksid, elektronid, kuid kõige enam on välja toodud molekulaarse hapniku kustutavat mõju luminescentssignaale. Hapniku keskkonnast eemaldamine on levinud moodus soodustamiseks toatemperatuuril mõõdetavat fosforestsentskiirgust.[9,11]

Asko Uri töörühmas on kohandatud meetodit molekulaarse hapniku mõju vähendamiseks, mida on kirjeldatud Baumannis artiklis [11]. Meetod põhineb asjaolul, et glükoosoksüdaas oksüdeerib glükoosi glükoonhappeks vaid molekulaarse hapniku juuresolekul, kõrvalsaadusena tekib vesinikperoksiid. Peroksiid, mis võib olla bioloogiliste katsete puhul toksiline, eemaldatakse katalaasiga, mille tagajärjel tekib vesi ja hapnik. Viimane seotakse taaskord glükoosoksüdaasi poolt ning nii väheneb üldine hapniku hulk süsteemis (Joonis 3).[11]



Joonis 3. Glükoosoksüdaasi ja katalaasi mõju hapniku sisaldusele.

2.3.2 Erinevad maatriksid

Pikaajalise tripletse oleku saavutamiseks on kasulik vähendada molekuli liikuvust, milleks toatemperatuuril sobib aine fikseerimine jäika keskkonda. Lihtsaimaks võtteks on kasutada jäika maatriksit, mis peaks olema optiliselt läbipaistev ning keemiliselt inertne. Samuti on maatriksi puhul oluline võime takistada luminescentssignaali kustutajate difusiooni.[9]

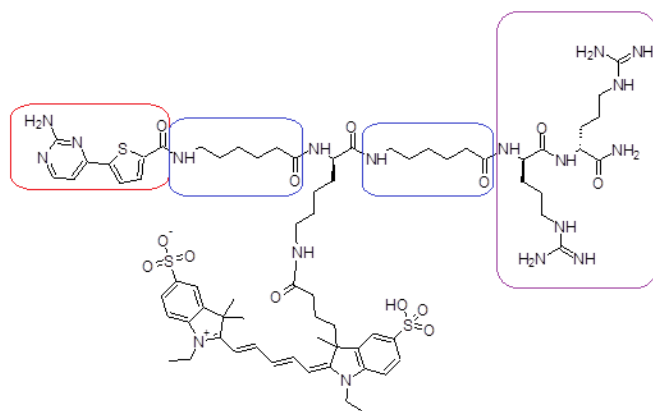
Maatriksina saab kasutada erinevaid polümeere, tseoliite, sool-geel kolloidlahuseid ja siloksaane. Fosfoorid võidakse siduda ka mitsellidesse, näiteks naatriumdodetsüülsulfaati. See vähendab mittekiirguslikke energia ülekandeid ning kaitseb osaliselt molekulaarse hapniku kustutava mõju eest. Samuti on võimalik kaitsta tripletset olekut ja tekitada toatemperatuurset fosforesentsi kasutades tsüklodekstriine. [9,10]

Tsüklodekstriinid on tsüklilised oligosahhariidid, mis koosnevad α -1,4 sidemega ühendatud D-glükoosi jääkidest. Kõige sagedamini kasutatakse α -, β - ja γ -tsüklodekstriine, mis koosnevad vastavalt kuuest, seitsmest ja kaheksast glükoosijäägist. [12]

β -tsüklodekstriin moodustab makrotasandil toruja struktuuri, mille sisediaameeter on 0,6...0,65 nm ja sügavus 0,79 nm. Hüdroksüülrühmad on suunatud torust väljapoole, muutes välispinna hüdrofiilseks, samal ajal, kui $-CH$ rühmad ning glükosiidsed eeterrühmad jäävad toru sissepoole. Madala polaarsusega sisemuse tõttu on β -tsüklodekstriin võimeline assotsieeruma sobiva suuruse ja kujuga mittepolaarsete molekulidega ilma kovalentset sidet moodustamata – tekivad van der Waalsi jõud kahe molekuli vahel. Olulist rolli assotsieerumisel omavad ka vesiniksidemed, mille abil saavad polaarsed ühendid β -tsüklodekstriiniga interaktsioone luua. [9,13]

2.3.3 ARC-Lum ja ARC-Lum(Fluo) sondid

Adenosiini analoogi ja oligoarginiini konjugaadid ehk ARC-id on bisubstraatsed proteiinkinaaside inhibiitorid. ARC-i molekuli adenosiini analoog seostub proteiinkinaasi ATP-taskusse ning peptiidne osa valksubstraadi taskusse. Kaks osa on omavahel ühendatud ühe või mitme linkeriga. ARC-ile on võimalik lisada fluorestsentsvärv ning kasutada saadud molekuli fluorestsentssondina (Joonis 4). [14]



Joonis 4. ARC-Lum(Fluo) sond ARC-2003 näitel. Punase kastiga on ümbritsetud nukleosiid analoog, sinise kastiga bisubstraatses inhibiitoris olevad linkerid ja violetse kastiga peptiide osa. Ilma kastita ala tähistab lüsiini kõrvalahela kaudu seotud fluorestsentsvärvi.

ARC-Lum sondid on ARC-id, mille adenosini analoog on väävlit või seleeni sisaldav aromaadne ühend. Vastavalt struktuurile jaotatakse need sondid kaheks: ARC-Lum sondid ning ARC-Lum(Fluo) sondid. ARC-Lum ja ARC-Lum(Fluo) sondide erinevus seisneb energia ülekande aktseptoris: ARC-Lum sondide korral aktseptor puudub, ARC-Lum(Fluo) tüüpi ühenditel on energia ülekande aktseptoriks fluorestsentsvärv, mis on ühendatud antud töö raames lüsiini kaudu peptiidahelaga. Kui sond komplekseerub valguga, seostub aromaadne struktuur proteiinkinaasi ATP-taskuga, mille tulemusena stabiliseerub doonorluminofoori tripletne olek ja tekib pika elueaga luminescentskiirgus. Kompleksi ergastades emiteeritakse oranži või punast luminescentskiirgust, mille eluiga jääb mikrosekundi skaalasse (19...250 μ s).[1,15]

Sondide eripäraks on asjaolu, et need ei sisalda nanoosakesi või metallikomplekse, mida tavaliselt toatemperatuuril pikaajalist luminescentskiirgust emiteerivad sondid sisaldavad. ARC-Lum(Fluo) sondidel tekib luminescentssignaali võimendumine FRET-i tulemusena doonorilt fluorestsentsvärvile. Försteri tüüpi energia ülekande eelduseks on aktseptori ergastusspektri ning doonori emissioonspektri kattumine, mis ARC-Lum(Fluo) sondide korral ka aset leiab. Väävlit või seleeni sisaldava fragmendi fosforestsentspektri vahemik on 500...600 nm, samas kui sobivate fluorestsentsvärvide neeldumisspektrid jäävad 500...700 nm alasse [16]. Seega on tõenäoline, et antud süsteemis FRET toimub. Kui toimub energia ülekande doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile, siis luminescentssignaali summaarne eluiga lüheneb (Valem 2). Energia ülekandumisel fluorestsentsvärvile luminescentssignaali võimendub, sest energia ülekande on antud juhul kiirem ja efektiivsem kui fosforestsentskiirgus. Kuna ARC-Lum(Fluo) sondide korral on erinevaid energia ülemineku võimalusi võrreldes ARC-Lum sondidega rohkem, on ka värviga ühendite summaarne luminescentssignaali eluiga väiksem.[1,15,16]

Kadri Ligi on arvutanud Försteri distantssi väärtuseks ARC-Lum(Fluo) sondides 2,6 nm. Selleks kasutati doonorluminofoorina seleeni sisaldavat aromaadset fragmenti PKAc kompleksis ja aktseptorluminofoorina fluorestsentsvärvi Cy3B. (avaldamata andmed)

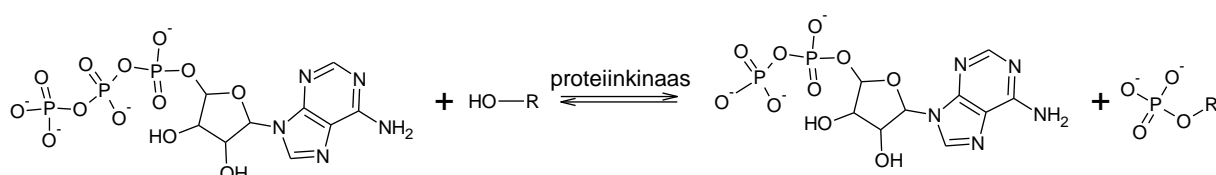
ARC-Lum sonde kasutatakse kinaaside kvantifitseerimiseks, kinaas-inhibiitor komplekside afiinsuse ja sidumiskineetika uurimiseks.[15]

2.4 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid (PK-d) on ensüümid, mis katalüüsivad γ -fosfaatrühma ülekannet adenosin-5'-trifosfaadilt (ATP-lt) valksubstraadile (Joonis 5). Selle reaktsiooni kaudu on reguleeritud umbes kolmandik valke inimese kehas. Fosforüleerimine mõjutab sihtvalgu

regulatsiooni ning kõrvalekaldeid normaalsest regulatsioonist seostatakse mitmete haigustega, näiteks vähktõvede erinevate tüüpidega, Alzheimeri tõve, diabeedi ja teiste haigustega. Seetõttu on PK-de aktiivsust mõjutavate ühendite arendamine huvipakkuv ravimitööstusele, et disainida uusi potentsiaalseid ravimeid.[14,17]

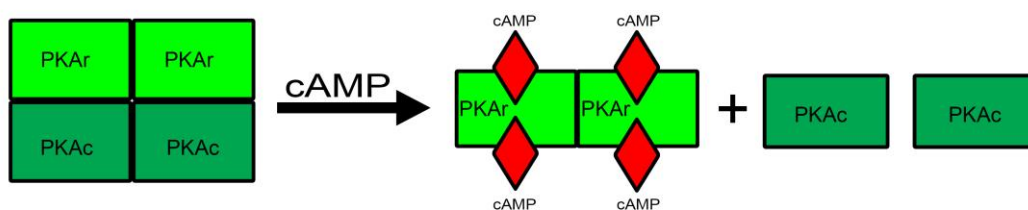
Lähtuvalt kinaasi primaarjärjestusest on PK-d jaotatud seitsmesse gruppi: CaMK, CMGC, TK, TKL, STE, CK1 ja AGC. AGC kinaasi perekonda kuulub 60 kinaasi enam kui 500-st inimese genoomis olevast kinaasist. Sellesse perekond kuuluvad näiteks PKA, PKG, PKC, Akt, S6K, RSK, MSK, PDK1 ja SDK. AGC rühma kinaasid katalüüsivad seriini/treoniini jääkide fosforüleerimist substraatides, millel kinaasi aktiivtsentrisse sobituval osal on positiivsed lüsiini ja/või arginiini jäägid.[18,19]



Joonis 5. γ -fosfaatrühma ülekanne ATP-lt valgule, R tähistab seriini, türosiini või treoniini jääk.

2.4.1 cAMP-sõltuv proteiinkinaas

cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA) oli esimene proteiinkinaas, mille kristallstruktuur määrati [20] ning seetõttu on see üks enim uuritud proteiinkinaase. PKA on holoensüüm, mis koosneb neljast alaühikust: kahest regulaatorsest (PKAr) ja kahest katalüütilisest (PKAc). PKA tetrameerne vorm on mitteaktiivne. Kui cAMP seostub regulaatorsete alaühikutega, vabanevad katalüütilised alaühikud. Need omakorda katalüüsivad fosfaatrühma ülekannet ATP-lt valksubstraadile (Joonis 6). PKA-le on leitud üle 370 valksubstraadi. Käesolevas töös kasutati PKAc-d mudelsüsteemina ARC-Lum(Fluo) luminescentssignaali uurimiseks.[18]



Joonis 6. PKAc vabanemine. PKAc tetrameerne esineb vorm madalatel cAMP-i kontsentratsioonidel holoensüümuna. Ensüüm adenülaadi tsüklaas katalüüsib ATP-st cAMP-i teket, mille tulemusena cAMP-i kontsentratsioon tõuseb ning molekulid seostuvad PKA regulaatorsele alaühikule (PKAr). Protsessi käigus vabanevad PKA katalüütilised alaühikud (PKAc), mis on võimelised fosforüleerima valksubstraate.

2.5 Inhibiitorid

Inhibiitorid on molekulid, mis pärsivad kinaasi normaalset toimimist. Inhibiitorid jagunevad kahte suuremasse klassi: pöörduvad ja mittepöörduvad inhibiitorid. Kõige tavalisemaks pöörduva inhibiitori tüübiks on konkurentsed inhibiitorid, mis vastavalt kinaasi aktiivtsentriga seostumisele jagunevad valksubstraat- ja ATP – konkurentseteks ning bisubstraatseteks inhibiitoriteks. Mittepöörduvad inhibiitorid moodustavad ensüümidega keemilisi sidemeid (tavaliselt kovalentseid) või hävitavad ensüümi mõne funktsionaalse rühma, mille tulemusena ensüümi aktiivsus väheneb.[21,22]

Kõige levinumad on ATP- konkurentsed inhibiitorid, mis omavad head afiinsust, kuid nende selektiivsus on madal, kuna rakus on palju nukleotiide siduvaid valke. Valksubstraadi-konkurentsete inhibiitorite disainimisel on seevastu võimalik saavutada väga kõrge selektiivsus, kuna PK-ga on küllaltki suur sidumisala ning sarnast valku seob vähem proteiinkinaase. Bisubstraatne inhibiitor on võimeline seostuma mõlema, nii ATP- kui ka valksubstraadi sidumistaskuga ning sellega saavutatakse küllaltki kõrge selektiivsus ja afiinsus.[14]

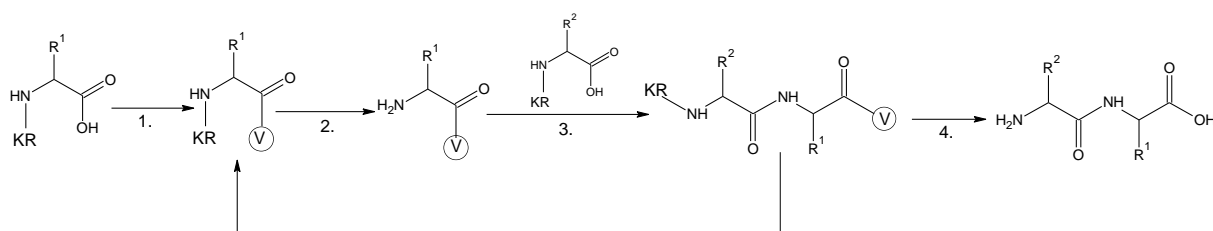
2.6 Tahkefaassüntees

1963. aastal pakkus R. B. Merrifieldi välja uudse peptiidisünteesimeetodi – tahkefaassünteesi (ingl *solid phase peptide synthesis* ehk SPPS).[23]

SPPS algab tahke kandja ehk vaigu valikuga. Vaikudena kasutatakse enamasti ristseotud polüstireeni, mille külge on kinnitatud kindel hulk funktsionaalrühmi, mis on edasisteks reaktsioonitsentriteks. Vaigu valikust ja olekust sõltub sünteesi edukus. Vaik peaks olema kasutatavas lahustis piisavalt pundunud ning ei tohiks sünteesi käigus laguneda. Samuti ei tohiks reaktsioonitsentritele toimuda sadenemisi, kuna need vähendavad reageerimisvõimeliste rühmade kättesaadavust ja seeläbi väheneb sünteesi saagis.[23]

Esimene aminohape kinnitatakse tahkele kandjale enamasti aminohappe karboksüülrühma kaudu (Joonis 7). Aminohape tuleb enne vaigule kandmist aktiveerida. Selleks kasutatakse SPPS-i puhul antud töös HBTU-d ning abiagentidena HOBt-i ja NMM-i segu. Vaigul oleva aminohappe kaitserühm eemaldatakse vahetult enne järgmise aminohappe lisamist. Seejärel lisatakse järgmine aminohape, mille aminorühm on kaitstud.[23]

Antud tegevust korratakse, kuni vastav aminohapete järjestus on saavutatud. Seejärel eemaldatakse kaitserühmad ning peptiid tahkelt kandjalt.[23]

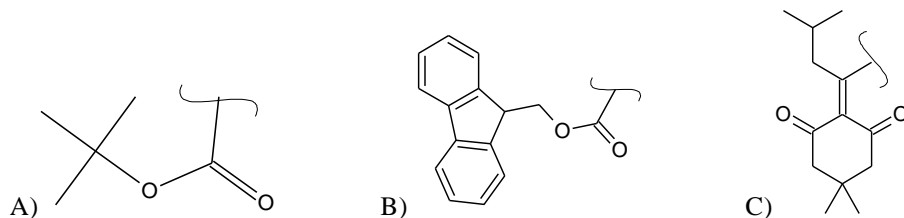


Joonis 7. Tahkefaasi peptiidsüntees. Joonisel tähistab KR- kaitserühma, V-vaiku. 1) Kaitserühmaga aminohape kinnitatakse vaigule. 2) Kaitserühm eemaldatakse. 3) Lisatav aminohape aktiveeritakse, mille tulemusena moodustab see vaigu küljes oleva aminohappega peptiidsideme. Samme 2 ja 3 korratakse, kuni soovitud peptiidi järjestus on saavutatud. 4) Peptiidi kaitserühmad eemaldatakse ja peptiid eemaldatakse vaigult.

2.6.1 Kaitserühmad

SPPS-i käigus tuleb kaitsta lisatava aminohappe aminorühm, et see ei saaks reaktsioonist osa võtta lämmastikul paikneva vaba elektronpaari kaudu ning ei toimuks kõrvalreaktsioone. Levinuimad kaitserühmad on Fmoc ja Boc. Esimese eemaldamiseks kasutatakse nõrka alust, tavaliselt 20 % piperidiini lahust DMF-is. Boc-i mahavõtmiseks kasutatakse tugevat hapet, tavaliselt TFA-d.[22,23]

Lüsiini kõrvalahelas oleva aminorühma kaitsmiseks kasutati antud töös ivDde kaitserühma (Joonis 8.C). IvDde kasutatakse lisaks lüsiinile ka ornitiini kõrvalahela kaitsmisel. IvDde võetakse maha hüdrasiinilahuses 2 % hüdrasiini lahusega.[24,25]



Joonis 8. Kaitserühmad: Boc (A), Fmoc (B) ja ivDde (C).

3 Kasutatud aparatuur ja meetodid

3.1 Kasutatud reagensid, aparatuur ja vahendid

Antud töös on kasutatud vaike ja teisi tahkefaasi peptiidsünteesi reagente firmadelt: NovaBiochem ja Iris Biotech. PromoFluor-647 NHS ester osteti firmalt PromoKine ja 5-Tamra Setareh Biotechist. Solvendid on ostetud firmadest Acros Organics, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, piperasiin Flukast, DTT Promegast. 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhape oli sünteesitud Kaido Vihti poolt (Tartu Ülikool). PVA (Mowiol® 10-98, Sigma-Aldrich) saadi Uno Mäeorult. Mõõtmisel kasutatud PKAc (inimese PKAc tüüp α) oli toodetud Engh-i jt. artikli [26] kohaselt Jevgenia Bredihhina (Rogosina) poolt.

ARC-ide kontsentratsioon on määratud NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektromeetriga, kasutatavaks programmiks NanoDrop2000.

Mõõtmisel kasutati mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar ning inkubaator-loksutit THERMOstar (mõlemad BMG Labtech).

Roteerimiseks kasutati Büchi rotaatoraurustit R-200. Mikrotiiterplaatidelt lahustijääkide aurustamiseks kasutati Christ-i vaakum-tsentrifugaalaurustit.

Mõõtmised teostati 384-süvendilistel Corning mikrotiiterplaatidel (kood 3676), mis on fluorestsentsmärgise suhtes vähesiduvad.

Pipeteerimiseks kasutati firma Eppendorf spetsiaalsete plastotstega automaatpipette ja lahused valmistati Eppendorf plasttubidesse, mis on fluorestsentsmärgiste suhtes vähesiduvad.

Mõõtmisandmeid analüüsiti Prism 5.0 (GraphPad) ja Microsoft Office Excel 2010 programmidega.

Ained (ARC-2000 kuni ARC-2018) on puhastatud Gerda Johanna Raidaru poolt kasutades kõrgefektiivse-vedelikkromatograafia (HPLC) süsteemi. Järgnevad ühendid on puhastatud töö autori poolt. Selleks kasutati Scimadzu LC Solution (Prominence) HPLC süsteemiga, Gemini C18 pöördfaas kolonni (5 μ m, 250 \times 4,6 mm), mis oli kaitstud Gemini C18 eelkolonniga (5 μ m, 4 \times 2,0 mm). Süstimine toimus käsitsi, detektorina kasutati dioodrea detektorit (SPD M20A). Eluendiks oli vesi-atsetonitriili segu (0,1 % TFA-d) gradiendina, mille voolukiirus oli 1 ml/min. ESI massispektrid mõõdeti Schimadzu LCMS-2020 positiivses ionisatsiooni režiimis.

3.2 ARC-ide süntees

Peptiidifragmendid sünteesiti vastavalt R. B. Merrifieldi poolt välja töötatud tahkefaasisünteesile, mida on täpsemalt kirjeldatud kirjandusülevaate 2.6 alapunktis.

Fmoc-Rink-Amid-MBHA (tootekood BR-1305) vaiku kaaluti 100 mg ning sellel lasti DMF-is punduda 40 minutit. N-terminaalses osas olev Fmoc-kaitserühm võeti maha 20 % piperidiini lahusega (5 + 15 minutit), sellele järgnes 5-kordne pesemine DMF-iga. Kaitstud aminohapped (3 ekvivalenti) ja aktivaatorite segu HBTU/HOBt (mõlemat 2,85 ekvivalenti) lahustati DMF-is, lisati NMM (10 ekvivalenti) ning saadud lahus lisati reaktsiooninõusse. Atsüülimisreaktsioon kestis 60...90 minutit toatemperatuuril, millele järgnes taas 5-kordne pesemine DMF-iga. Iga aminohappejäägi kinnitumist kontrolliti Kaiseri testi abil (alapunkt 3.2.1). Protseduure korrati soovitud peptiidifragmendi saavutamiseni. ARC-2000 kuni ARC-2011 korral oli lüsiini kõrvalahel kaitstud ivDde kaitserühmaga, mis eemaldati 2 % hüdrasiini lahusega DMF-is (ruumala põhjal) (3 korda 5 minutit). Seejärel lisati kaitstud aminohape koos aktivaatoritega (ekvivalendid toodud eespool) ning lasti atsüülimisreaktsioonil toimuda. ARC-2000 ning ARC-2006 korral aga ei soovitud lüsiini kõrvalahela kaudu järgmist aminohapet lisada, järgnes produkti eemaldamine vaigult.

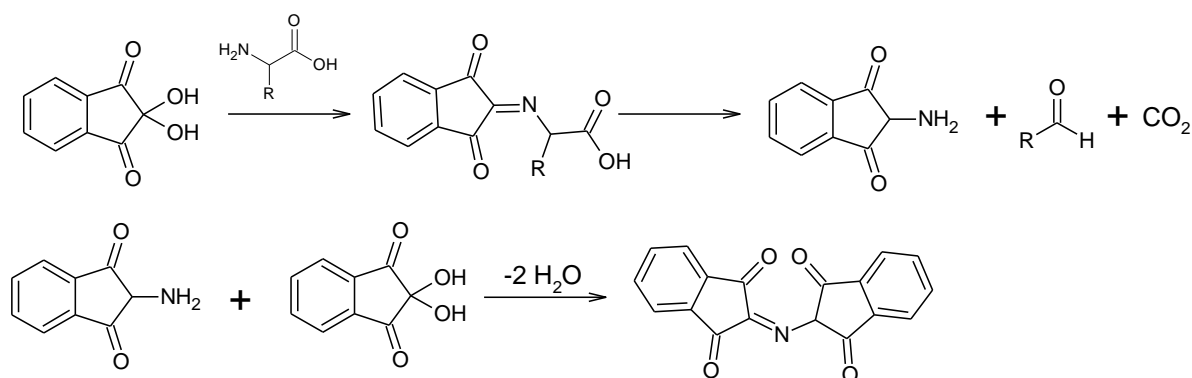
Produkti mahavõtmisele vaigult eelnes pesemine 3 erineva solvendiga: 5 korda DMF-iga, 5 korda propaan-2-ooliga ning 5 korda DCE-ga ning produkt kuivatati vaakumis (1 h). Produkti eemaldamiseks vaigult kasutati TFA/H₂O/TIPS (90/5/5 ruumala põhjal) segu (3 h). Lahus koguti ümarkolbi ja lahusti eemaldati rotaatoraurustiga. Produktile lisati vett (3 korda 1 ml) ning aurutati solvendid TFA jääkide eemaldamiseks ning dietüüleetriega TIPS-i eemaldamiseks (1 kord 1 ml). Produkt puhastati HPLC-ga.

Puhastatud produktile lisati fluorestsentsvärv, et uurida luminesentssignaali kustumist ARC-Lum(Fluo) sondides. Selleks võeti sünteesitud aine suhtes 1,5 ekvivalenti fluorestsentsvärvi ning mõlemad lahustati DMSO-s. Värvile lisati 5 % trietüülamiini lahust DMSO-s ning lahused segati kokku ja lasti reaktsioonil kulgeda 4 tundi kuni üleöö. Lahusti aurutati vaakum-rotatoraurustis ning produkt puhastati HPLC-ga.

Ainsaks erandiks oli ARC-2023 süntees, kus kaaluti 10 mg 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhapet ning lahustati DMF-is. Samuti kaaluti piperasiini (3 ekvivalenti) ja HBTU-d (1 ekvivalent) ning lahustati mõlemad eraldi DMF-is. Ümarkolbi pipeteeriti lahustatud tiofeen, millele lisati eelnevalt kokkusegatud DIPEA (3 ekvivalenti), HBTU ning piperasiini lahus. Reaktsioon kulges toatemperatuuril 3 tundi. Seejärel eemaldati rotaatoraurustiga lahusti ning produkt puhastati HPLC-ga. Puhastatud produktile lisati fluorestsentsvärv.

3.2.1 Kaiseri test

Atsüülimisreaktsiooni täielikkuse kontrollimiseks kasutatakse Kaiseri testi (Joonis 9). Kaiseri test on kiire ja tundlik värvusreaktsioon, mille usaldusväärsus on üle 99 %. Selleks segati kokku 5 % ninhüdroksiini lahus etanoolis (ruumala põhjal) ja 80 % fenooli lahus etanoolis (ruumala põhjal), võttes mõlemat lahust 10 µl. Paar pestud vaigutera asetati lahuste segusse ning soojendati mõned minutid. Vabade aminohapete olemasolul värvusid vaiguterasid siniseks. Kui siniseid vaiguterasid oli märgatavalt, tuli atsüülimisreaktsiooni korrata või reageerimata aminorühmad katta, kasutades etaananhüdriidi.[27]



Joonis 9. Kaiseri testi kirjeldav mehhanism. Lõpp-produkt tekib vaba aminohappe olemasolul ning selle värvus on sinine.

3.3 ARC-ide kontsentratsiooni määramine

Inhibiitorite kontsentratsiooni määramiseks kasutati tilgaspektromeetrit NanoDrop 2000c.

Spektromeetri pjedestaal puhastati Milli-Q veega, mõõdeti lahusti spekter, mille järgi nulliti näit. Seejärel mõõdeti inhibiitorit sisaldava lahuse spekter. Vastavalt Lambert-Beer'i seadusele: $A = \varepsilon_{\lambda} c l$, kus A on optiline neelduvus, c kontsentratsioon, ε_{λ} molaarne neeldumiskoeffitsient kindlal lainepikkusel ja l optiline teepikkus, arvutati inhibiitori kontsentratsioon lahuses. Molaarsete neeldumiskoeffitsientidena kasutati tootja poolt määratud koefitsiente: 5-TAMRA korral $\varepsilon = 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja PromoFluor-647 $\varepsilon = 250000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhappe korral, kui $\text{pH} = 2$, siis $\varepsilon = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]. Optiline teepikkus antud masinat kasutades oli 0,1 cm.

3.4 ARC-Lum(Fluo) sondide uurimine

Sondide uurimiseks kasutati nelja erinevat lähenemist: ARC-id kompleksis PKAc-ga, ARC-id kompleksis β -tsüklodekstriiniga, ARC-id PVA-s ning ARC-id agarosis. Mikrotiiterplaadilugeja eluigade mõõtmisrežiimi õigsuse kontrolliks mõõdeti standardina euroopium(III)kelaadi luminescentssignaali eluiga ning võrreldi seda kirjanduse andmetega. Mõõdetud elueaks saadi $0,97 \pm 0,13 \text{ ms}$, kirjanduses on toodud aine luminescentssignaali

elueaks 1,02 ms [28]. Mõõtmisel kasutati Milli-Q vees lahustatud euroopium(III)kelaati, mille kontsentratsioon oli 50 nM. Luminestsentssignaali eluiga mõõdeti optilise mooduliga: [ergastus (EX) 337 (305-350), emissioon (EM) 615 (10)]. Siin ja edaspidi on toodud sulgudes filtri laius (nm) ning kui emissioonil on toodud kaks erinevat lainepikkust, siis on mõõteblokil kaks erinevat kanalit, mille kaudu saab emissiooni mõõta.

3.4.1 ARC-ide komplekseerumine PKAc-ga

Sondide erinevate parameetrite uurimiseks valmistati kahekordne lahjendusseeeria kinaasist. Lahjendusseeeria algkontsentratsioon oli 200 nM. Mõõtmisüvendsisse lisati ARC-i lõppkontsentratsiooniga 10 nM. Mõõtmisüvenditesse lisatud lahuste lõppruumalaks oli 20 µl. Mõõtmisel kasutatava puhverlahuse sisaldus: 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,005 % Tween-20, 5 mM DTT ning 7,5 µM BSA. Puhvri mõju hindamiseks mõõdeti ka süvendeid, kuhu oli pipeteeritud vaid puhvrit.

Mõõtmistele eelnes lahuste inkubeerimine 30 °C juures 15 minutit. PromoFluor-647 korral kasutati luminestsentssignaali kustumise mõõtmiseks optilist moodulit [EX 337(50), EM 675(50); 620(10)]. 5-TAMRA korral kasutati selleks optilist moodulit [EX 337(20), EM 590(50); 545(10)]. Mõõtmisel kasutati 50 µs viivitusaega ning signaali koguti 750 µs.

Luminestsentssignaali eluea andmed on antud mitme päeva keskmistatud tulemustena ning mõõtemääramatus on leitud eksperimentaalse standardhälbe korrutisena katteteguriga, milleks ca 95% usaldusnivoo juures on 2.

3.4.2 ARC-ide komplekseerumine β-tsüklodekstriiniga

Valmistati kahekordne lahjendusseeeria β-tsüklodekstriinist, algkontsentratsiooniks oli 10 mM ning lõppkontsentratsiooniks 0.08 mM lahus puhvris. Puhvrina kasutati 50 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,005 % Tween-20. ARC-i kontsentratsiooniks lõpplahuses oli 100 nM. Mõõdeti korduspunktid hapniku juuresolekul ning hapnikuta. Hapniku väljatõrjumiseks mõõtesüvenditest lisati mõõtelahustesse glükoosi, mille lõppkontsentratsioon süvendis oli 25 mM, ja glükoosoksüdaasi 2 aktiivset ühikut/ml.

Mõõtmisele eelnes lahuste inkubeerimine 30 °C juures 15 minutit. Luminestsentssignaali kustumise ning intensiivsuse mõõtmiseks kasutati optilist moodulit [EX 337(20), EM 590(50); 545(10)], viivitusaeg 50 µs ning signaali koguti 750 µs.

3.4.3 ARC-id PVA-s

ARC-ide luminestsentssignaali eluigade uurimiseks PVA-s valmistati 5 % ja 10 % PVA lahus Milli-Q vees (massi järgi). 5 % lahuse jaoks kaaluti 1,03 grammi PVA-d ja lisati 19 ml Milli-Q vett ning kuumutati 100 °C juures segades üleöö. 10 % lahuse jaoks kaaluti

0,52 grammi PVA-d ning lahustati 4,5 ml Milli-Q vees ja toimiti samamoodi nagu 5% lahusega. 20 µl homogeenset PVA lahust pipeteeriti Eppendorfi 0,5 ml tuubi. Lisati 1 µl kindlas kontsentratsioonis (kas 1 või 5 µM) ARC-i lahust Milli-Q vees ning segati lahus homogeenseks. Tuubist kanti 20 µl lahust mõõtmisüvendisse ning mikrotiiterplaat asetati kappi, kus lahustil lasti toatemperatuuril vähemalt 48 tundi aurustuda.

Mõõtmistele eelnes inkubeerimine 30 °C juures 15 minutit. Luminestssignaali kustumise mõõtmisteks kasutati optilist moodulit: [EX 337(20), EM 590(50); 545(10)]. Mõõtmised teostati erinevatel režiimidel: viivitusaeg 50 µs, signaali kogumine 750 µs; viivitusaeg 50 µs, signaali kogumine 1200 µs ja viivitusaeg 40 µs, signaali kogumine 1700 µs.

Seejärel vakumeeriti mikrotiiterplaati 24 tundi vaakum-rotatoraurustiga ning korrati mõõtmisi samadel tingimustel.

3.4.4 Singlett-singlett FRET-i uurimine ARC-Lum(Fluo) sondides

Singlett-singlett FRET-i realiseerumist ARC-ides on võimalik kindlaks teha ergastades eraldi väävlit sisaldavat fragmenti ja fluorestsentsvärvi. Selleks mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust erinevate optiliste moodulitega. Kasutatud ARC-ide lahused olid 10 nM ning lahustatud 50 mM HEPES (pH 7,5) puhvris, mis sisaldas ka 150 mM NaCl ja 0,005 % Tween-20. Mõõdeti statsionaarsetes tingimustes (ilma viivitusajata), kasutades optilist moodulit [EX 337(20), EM 590(50); 545(10)]. 5-TAMRA- fragmendi otsese ergastuse korral kasutati optilist moodulit [EX 540(20), EM 665(50); 590(20)].

3.4.5 ARC-id agarosis

Paralleelselt PVA katsetega teostati mõõtmisi ka agarosis maatriksis. Selleks valmistati 2 % agarosis (massi järgi) Milli-Q vees, mis lahustati mikrolainete abil. Mõõtesüvendi põhja pipeteeriti 1 µl kindlas kontsentratsioonis (kas 1 µM või 5 µM) ARC-i lahust ning lisati 20 µl 2 % agarosis lahust. Pipeteerimisega segati mõõtesüvendis olevat lahust, et ARC-i jaotumine agarosis oleks ühtlane. Agarosisil lasti kalgenduda umbes 30 minutit. Mõõdeti luminestssignaali intensiivsust ning eluiga kasutades optilist moodulit [EX 337(20), EM 590(50); 545(10)].

4 Tulemused ja arutelu

4.1 Sünteesitud ARC-id

Bakalaureuse töö raames sünteesiti 23 ARC tüüpi ühendit, et uurida neis toimuva energia ülekande sõltuvust. Tabelis 1 on toodud sünteesitud ARC-ide struktuurid lühenditena.

Tabel 1. ARC-ide koodid koos struktuuri lühenditega.

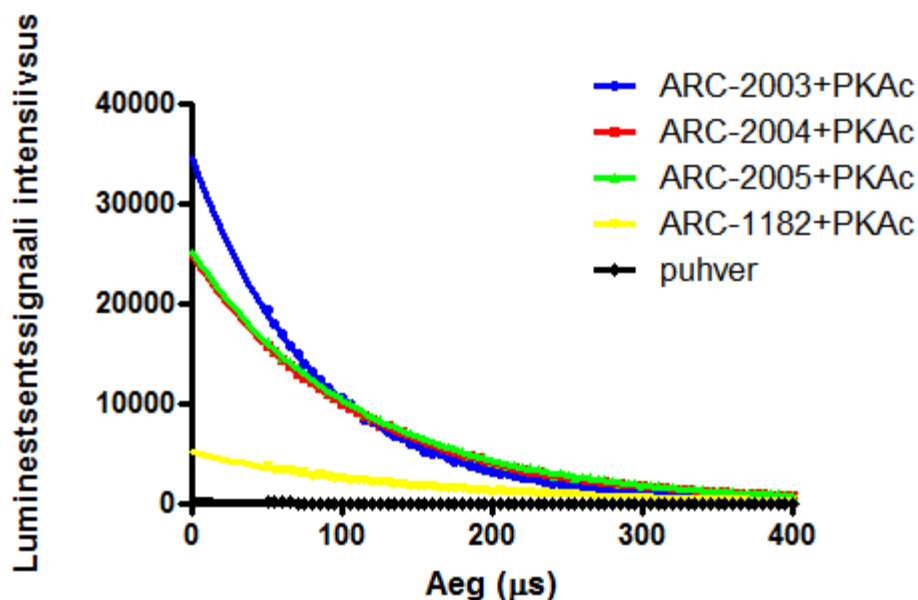
ARC-i kood	Struktuurid lühenditena
ARC-2000	AMTH-Ahx-DLys-Ahx-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2001	AMTH-Ahx-DLys[Ahx-]-Ahx-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2002	AMTH-Ahx-DLys-[AEEA-AEEA]-Ahx-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2003	AMTH-Ahx-DLys[PromoFluor-647]-Ahx-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2004	AMTH-Ahx-DLys[PromoFluor-647-Ahx-]-Ahx-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2005	AMTH-Ahx-DLys[PromoFluor-647-AEEA-AEEA-Ahx-]-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2006	AMTH-Ahx-DArg-LLys-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2007	AMTH-Ahx-DArg-LLys[Ahx-]-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2008	AMTH-Ahx-DArg-LLys-[AEEA-AEEA]-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2009	AMTH-Ahx-DArg-LLys[PromoFluor-647]-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2010	AMTH-Ahx-DArg-LLys[PromoFluor-647-Ahx-]-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2011	AMTH-Ahx-DArg-LLys[PromoFluor-647-AEEA-AEEA-]-βAla-DArg ₂ -NH ₂
ARC-2013	AMTH-LPro ₃ -Dpr-NH ₂
ARC-2014	AMTH-LPro ₄ -Dpr-NH ₂
ARC-2015	AMTH-LPro ₅ -Dpr-NH ₂
ARC-2016	AMTH-LPro ₃ -Dpr[5-TAMRA]-NH ₂
ARC-2017	AMTH-LPro ₅ -Dpr[5-TAMRA])-NH ₂
ARC-2019	AMTH-LPro-Dpr-NH ₂
ARC-2020	AMTH-LPro ₂ -Dpr-NH ₂
ARC-2021	AMTH-LPro-Dpr[5-TAMRA]-NH ₂
ARC-2022	AMTH-LPro ₂ -Dpr[5-TAMRA]-NH ₂
ARC-2023	AMTH-PIP
ARC-2024	AMTH-PIP-5-TAMRA

4.2 ARC-Lum(Fluo) sondide luminescentssignaali eluea määramine

ARC-Lum(Fluo) sondide iseloomustamiseks mõõdeti luminescentssignaali eluiga. Antud suurus valiti mõõtmiseks, kuna luminescentssignaali eluiga on otseses seoses FRET-i efektiivsusega (Valem 2). Samuti on ARC-Lum(Fluo) sondide puhul tehtud eeldus, et luminescentssignaali eluiga ei sõltu kontsentratsioonist, seetõttu ei muutu eluead mõõtepäevade lõikes oluliselt.

4.2.1 ARC-ide komplekseerumine PKAc-ga

ARC-ide ja PKAc korral teostati mõõtmisi 50 μ s viivitusajaga, et vältida taustmüra, mis tuleneb ksenoonvälklampi kasutavast aparatuurist ning samuti proovide autofluorestsentsist. Võrdlusena mõõdeti ARC-1182 ja PKAc kompleksi luminescentssignaali kustumist ajas [1].

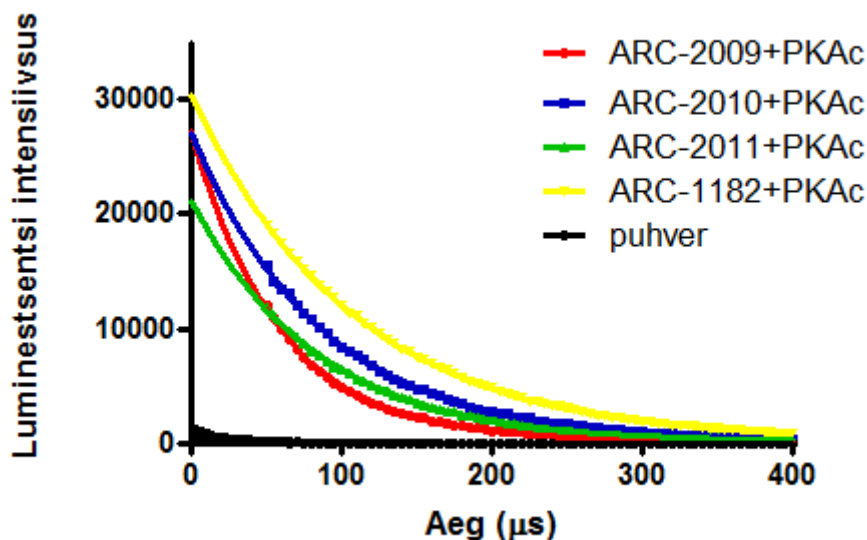


Joonis 10. ARC-2003 kuni ARC-2005 sondide luminescentssignaali kustumine ajas. ARC-2003 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (sinine), ARC-2004 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (punane), ARC-2005 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (roheline), ARC-1182 (5 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (kollane), puhver (must).

Jooniselt 10 on näha luminescentssignaali kustumise tendentse antud ARC-ide puhul. Antud tendentsid on kooskõlas FRET-i teooriaga (Valem 2), kus $E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$. Mida pikemaks linker muutub, seda suuremaks muutub ka vahemaa doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori vahel (r_{DA}) ning energia ülekande efektiivsus väheneb, millest tulenevalt luminescentssignaali eluiga pikeneb.

ARC-2003 luminescentssignaali elueaks määrati $79 \pm 13 \mu$ s, ARC-2004 $104 \pm 15 \mu$ s ning ARC-2005 $109 \pm 8 \mu$ s. Need ARC-Lum(Fluo) sondid erinevad üksteisest lüsiini ja

fluorestsentsvärvi vahele jääva linkeri pikkuse poolest, kusjuures ARC-2003 linker peptiidahela ja fluorestsentsvärvi vahel puudub ning ARC-2005 on pikim linker.



Joonis 11. ARC-2009-2011 sondide luminescentssignaali kustumine ajas. ARC-2009 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (punane), ARC-2010 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (sinine), ARC-2011 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (roheline), ARC-1182 (10 nM) kompleks PKAc-ga (200 nM) (kollane), puhver (must).

Samuti nagu eelmises seerias (ARC-2003 kuni ARC-2005) ei erine ka selles kolmikus viimase kahe ARC-i luminescentssignaali eluead üksteisest väga palju. ARC-ide luminescentssignaali eluead olid vastavalt: ARC-2009 $58 \pm 4 \mu\text{s}$, ARC-2010 $88 \pm 18 \mu\text{s}$ ning ARC-2011 $85 \pm 10 \mu\text{s}$. Võrreldes eelmise seeriaga ei tulnud ARC-2009 kuni ARC-2011 korral sama hästi välja luminescentssignaali eluea ning linkeri pikkuse sõltuvus. Seda võib seletada struktuuri painduvusega. Kuna linkerina kasutati paindlikke struktuure, siis komplekseerudes PKAc-ga, saavad ARC-id väänduda. Paindliku linkeri korral võivad doonorluminofoor ja aktseptorluminofoor paikneda kompleksis kinaasiga ligistikku, olenemata nende vahelise linkeri pikkusest.

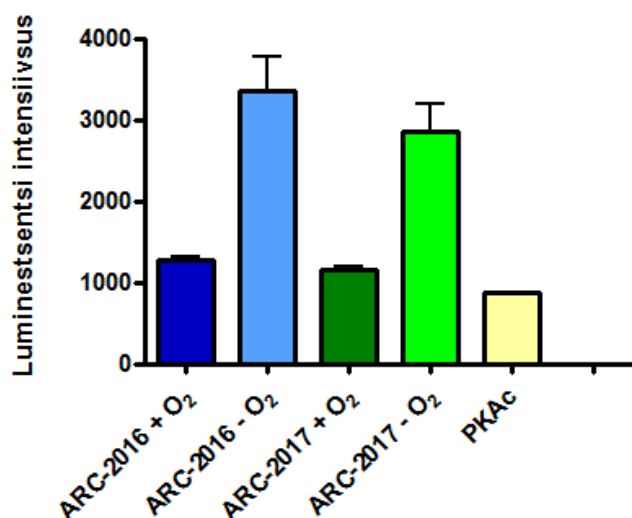
Tabel 2. ARC-2003 kuni ARC-2011 luminescentssignaali eluigade (μs) võrdlus.

ARC-2003	ARC-2004	ARC-2005	ARC-2009	ARC-2010	ARC-2011
79 ± 13	104 ± 15	109 ± 8	58 ± 4	88 ± 18	85 ± 10

Eelnevalt sünteesitud ARC-ide seeriatega ei saavutatud piisavalt üheseid sõltuvusi distantsti ja luminescentssignaali eluea vahel. Samuti puudus võimalus kindlalt määrata doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori omavahelist kaugust kinaasi kompleksis, kuna tegemist on painduvate struktuuridega. Ühesemaks distantsti määramiseks tekkis vajadus

jäigemate struktuuride järele, milleks valiti oligoproliidid. Kirjanduses on välja toodud, et oligoproliid saab kasutada molekulaarse joonlauana distantside määramisel, sest oligoproliid ahel on suhteliselt jäik ja moodustab 3-dimensionaalses ruumis sirge struktuuri, mida nimetatakse proliini heeliksiks. Siiski võib ka selles toimuda mõnevõrra amiidsideme rotatsioone, mis muudaks struktuuri painduvamaks ja põhjustab umbes 2% tõenäosusega ahela kõverdumist [29]. Lühemate järjestuste puhul ei ole see aga väga oluline Ühe proliinijäägi pikkuseks arvatakse proliini heeliksis olevat 0,3 nm [30]. Samuti on tõestatud oligoproliid kasutades, et FRET tüüpi üleminek sõltub doonori ja aktseptori vahelise kauguse kuuendast astmest [31]. Samas on välja toodud, et polüproliini ahela kujutamine jäiga ja sirge pulgana, on pikemate ahelate korral ($n=12$) kaheldav, kuna aina suureneb tõenäosus, et heeliksis on vähemalt üks proliinijääk *cis*-konformatsioonis, mis tekitab sirgesse ahelasse kõverduse[29].

Disainiti uus seeria, mis täies usalduses sisaldas linkerina 0...3 ning 5 proliini, kuid algsed katsed on teostatud 3 ja 5 proliini sisaldavate ARC-idega. Proliidide kasutamine võimaldab ühesemalt fikseerida doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori vahelist distantsti. Seeria abil uuriti energia ülekande sõltuvust luminofooride vahekaugusest. Prooviti sidumiskatset PKAc-ga, et määrata ARC-ide luminesentssignaali eluea sõltuvust luminofooride vahel oleva ahela pikkusest. Uuel seerial kasutati samuti doonorluminofoorina 5-(2-aminopürimidiin-4-üül)tiofeen-2-karboksüülhapet, kuid fluorestsentsvärvinäitajaks kasutati PromoFluor-647 asemel 5-TAMRA.



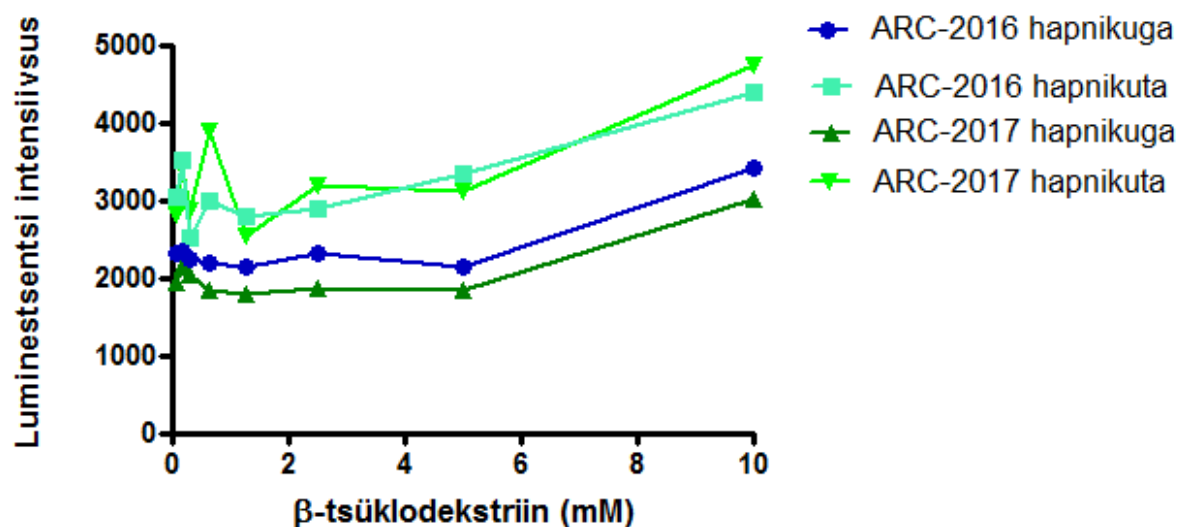
Joonis 12. ARC-2016 ja ARC-2017 sondide luminesentssignaali intensiivsus. ARC-2016 (100 nM) kompleks PKAc-ga (100 nM) hapniku juuresolekul (tumesinine) ja hapnikuta (helesinine) ja ARC-2017 (100 nM) kompleks PKAc-ga (100 nM) hapniku juuresolekul (tumeroheline) ja hapnikuta (heleroheline). Kollane tulp kirjeldab PKAc ja puhvri intensiivsust hapniku juurdepääsul.

Jooniselt 12 on näha, et signaali intensiivsus on väga madal. Hapniku juuresolekuta see tõuseb küll umbes kolm korda, kuid jääb luminescentssignaali eluea mõõtmiseks ikkagi liialt madalaks. See viitab, et need ARC-id on PKAc suhtes väga madala afiinsusega ja kasutatud kontsentratsioonide korral kompleksi moodustamist ei toimu. Seetõttu on luminescentssignaali intensiivsus praktiliselt olematu ning saadud andmeid ei saa FRET-i efektiivsuse uurimisel kasutada.

4.2.2 ARC-ide ja β -tsüklodekstriini kompleks

Kuna eelnevalt kirjeldatud katse ei andnud soovitud tulemusi, sest ARC-2016 ja ARC-2017 PKAc-ga ei seostunud ning luminescentssignaali eluigade määramine polnud võimalik, viidi läbi uus katse kasutades β -tsüklodekstriini.

Oletati, et β -tsüklodekstriin ja ARC-ide aromaatsed fragmendid moodustavad omavahel kompleksi, mis stabiliseerib doonorluminofoori tripletset olekut ning tekib mõõdetav luminescentssignaali, mille eluiga saab määrata. Selleks valmistati β -tsüklodekstriinist kahekordsete lahjenduste seeria alates 12,5 mM ja lõpetades 0,1 mM lahusega. Kuna aromaatsete ühendite afiinsus tsüklodekstriinide suhtes jääb millimolaarsesse suurusjärku, sai see ka lahjendusseeria valikul määravaks [12]. ARC-ide kontsentratsioon kõikides mõõtesüvendites oli 100 nM. Sooritati paralleelkatsed hapniku juuresolekuta ning hapnikuga, kasutades 2.3.1 punktis kirjeldatud meetodit hapniku eemaldamiseks (Joonis 13).



Joonis 13. β -tsüklodekstriini ja ARC-i kompleksi luminescentssignaali intensiivsus varieerides β -tsüklodekstriini kontsentratsiooni.

Katsest selgus, et antud meetodiga ei saavutatud pika elueaga luminescentssignaali. Komplekseerumine ARC-i ja β -tsüklodekstriini struktuuriga ei toimu või sellises kompleksis

ei teki ARC-il pika elueaga luminescentssignaali. On võimalik, et komplekseerumine ei fikseeri doonorluminofoori tripletset olekut piisavalt ning toimub luminescentssignaali kiire kustumine.

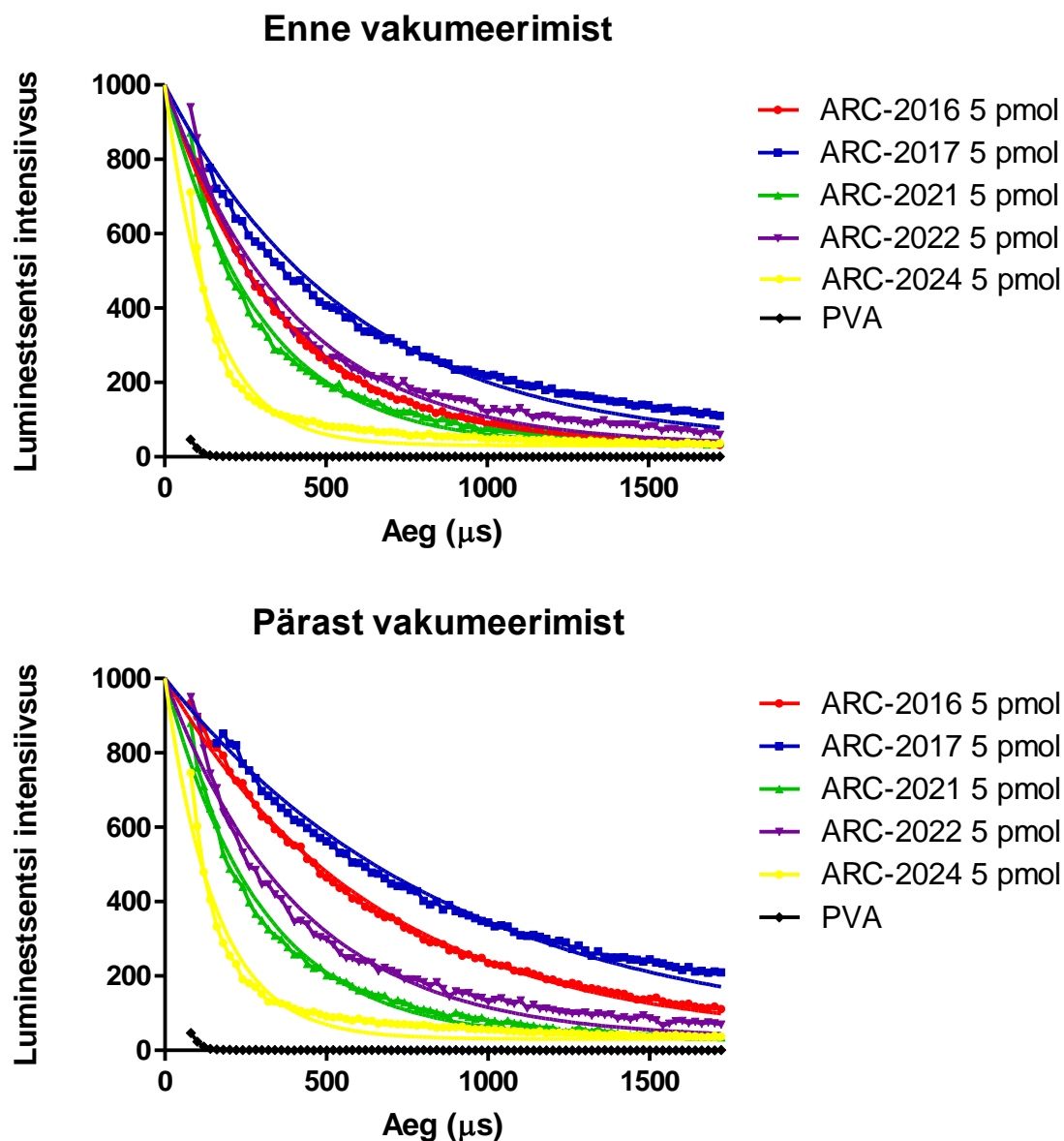
4.2.3 ARC-id PVA-s

Järgmisena prooviti saada proliini seeria ühenditega pika elueaga luminescentssignaali, kasutades nende dopeerimist polümeeri. Selleks lisati PVA vesilahusele kindla kontsentratsiooniga uuritavat ARC-i ja lasti sellel mikrotiiterplaadi süvendis kuivada. Seejärel mõõdeti saadud polümeeri kile luminescentssignaali eluiga.

Meetodi väljatöötamisel varieeriti mitmeid parameetreid, nende hulgas PVA lahuse kontsentratsiooni, ARC-ide lahuste kontsentratsioone, aurustustingimusi ning andmete analüüsi. Algselt kasutati 5 % PVA lahust MilliQ vees, kuid polümeeri kuivamine mõõtesüvendi seinale ja põhja oli ebaühtlane ning korduspunktide signaalide intensiivsused ei langenud kokku. Seetõttu prooviti mõõtmisi edaspidi teostada 10 % PVA lahusega, millega saadi paremad tulemused. 10 % PVA korral tekkis õrn ja küllaltki ühtlane kiht mõõtesüvendi seinale, kuid selle pipeteerimine oli raskendatud lahuse viskoossuse tõttu.

Algselt teostati katseid ühenditega, mis sisaldasid 1..3 ning 5 proliini. Tulemuste põhjal tekkis huvi veelgi kiiremaks luminescentssignaali kustumiseks ning selle uurimiseks sünteesiti ka proliiniga ühend ARC-2024. ARC-2024 koosnes tiofeenist ja 5-TAMRA-st, mis olid omavahel ühendatud piperasiiniga. Samamoodi nagu eelnevate ARC-ide korral toimus FRET üleminek väävlit sisaldavalt aromaatselt ühendilt 5-TAMRA-le. Piperasiin sobib linkeriks doonori ja aktseptori vahele isegi paremini kui 2,3-diaminopropaanhape, mida on kasutatud eelnevate ARC-ide puhul. Piperasiin võiks olla parem linker, kuna molekul on jäigem võrreldes 2,3-diaminopropaanhappega ning molekuli erinevate konformatsioonide arv on väiksem, seega oleksid distantid ühesemalt määratavad.

Proove analüüsiti tavaliselt 48 tundi pärast pipeteerimist, kui mõõtesüvendid olid kuivad. Kwon ja teised on näidanud, et mõnede ainete fosforescentssignaali intensiivsus PVA-s on lineaarses sõltuvuses mõõteobjekti niiskustasemest – mida suurem on niiskustase, seda väiksem on fosforescentssignaali intensiivsus [10]. Seega prooviti vähendada niiskuse osakaalu mõõtmistel, selleks kuivatati mikrotiiterplaati vaakum-tsentrifuugiga 24 tundi. Pärast seda teostati samadel tingimustel uued mõõtmised ning selgus, et luminescentssignaali eluead natukene pikenesid (Joonis 14, Tabel 3) ja katsepunktide hajuvus vähenes.



Joonis 14. Vakumeerimise mõju luminesentssignaali elueale. Tulemused on normeeritud luminesentssignaali intensiivsuste järgi.

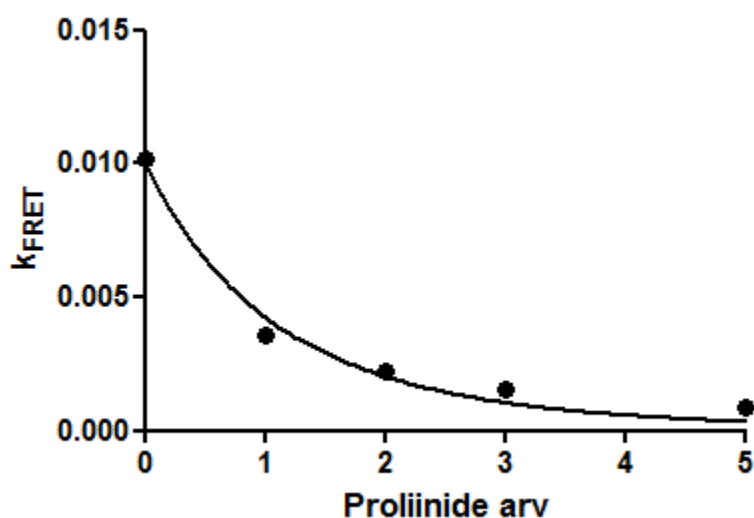
Tabel 3. ARC-ide luminesentssignaali eluigade võrdlus enne ja pärast vakumeerimist

	ARC-2024	ARC-2021	ARC-2022	ARC-2016	ARC-2017
Enne (μ s)	94 ± 33	269 ± 89	408 ± 86	596 ± 164	1034 ± 222
Pärast (μ s)	98 ± 11	274 ± 68	429 ± 79	628 ± 106	1058 ± 178

ARC-ide luminesentssignaali kustumist ajas mõõdeti samades süvendites uuesti 7 päeva pärast ning selgus, et need pole väga palju muutunud. Vähene muutumine võib olla tingitud lisakuivatamisest, kuna mikrotiiterplaati vakumeeriti eelnevalt taaskord 24 tundi. Samas ei erine ARC-ide luminesentssignaalide eluead pärast nädala möödumist üle 3 %. Seega pole polümeeriga keemilises mõttes midagi juhtunud ning samade mõõtesüvendite puhul on võimalik luminesentssignaali korduvalt mõõta.

Prooviti ka vaakumsentrifuugimist vahetult pärast pipeteerimist. Eeldati, et polümeer vajub raskusjõu mõjul mõõtesüvendi põhja ning nii on võimalik saada korratavamad tulemused. Selle asemel tekkis mõõtesüvenditele aga klaasjas vaht ning tulemuste kõikumise diapasoos oli veelgi suurem.

Enamasti analüüsiti andmeid ühekomponentse eksponentsiaalse kustumise võrrandiga, kuid prooviti analüüsida ka kahekomponentse eksponentsiaalse kustumise kõveraga. Sellest loobuti, kuna saadud parameetrid varieerusid suhteliselt palju. Kahekomponentse eksponentsiaalse kustumise kõveraga analüüsil erinesid lühiealise ja pikema-ealise komponendi suhted ja eluead paralleelkatsete korral väga palju, ega andnud seletatavaid tulemusi. Samas ühekomponentse eksponentsiaalse funktsiooni lähendamine andis hästi kokkulangevad tulemused, kuigi oli näha, et see ei kirjelda protsessi päris täpselt. Luminestsentssignaali kustumine ei ole aga antud juhul kindlasti ühekomponentne, millele viitavad ka graafikul kustumist kirjeldavast joonest kõrvalekalduvad punktid (Joonis 14). Ühekomponentne analüüs ei saa olla täpne ka seetõttu, et ülemineku dipoolide asendid PVA-s omavad mitte teadaolevat jaotust ning need ei saa ka molekulide konformatsiooniliste liikumiste kaudu keskmistuda nagu see tõenäoliselt toimub ARC-Lum(Fluo) sondidega lahuses. Seega on ühekomponentnilisel eksponentsiaalsel kustumisel määratud FRET-i efektiivsused paljude olekute keskmistatud väärtused. Kuna jäigas struktuuris on doonor ja aktseptor fikseeritud, on igal doonori ja aktseptori paaril oma orientatsioonifaktor. Lihtsustust, et $\kappa^2 = 2/3$ ei ole mõistlik teha ka seetõttu, kuna antud konstant on leitud süsteemile, kus doonori ja aktseptori orientatsioon muutub kiiremini võrreldes ergastatud elueaga [32]. Kui on tegemist aga fikseeritud süsteemiga, siis see nii kindlasti ei ole.

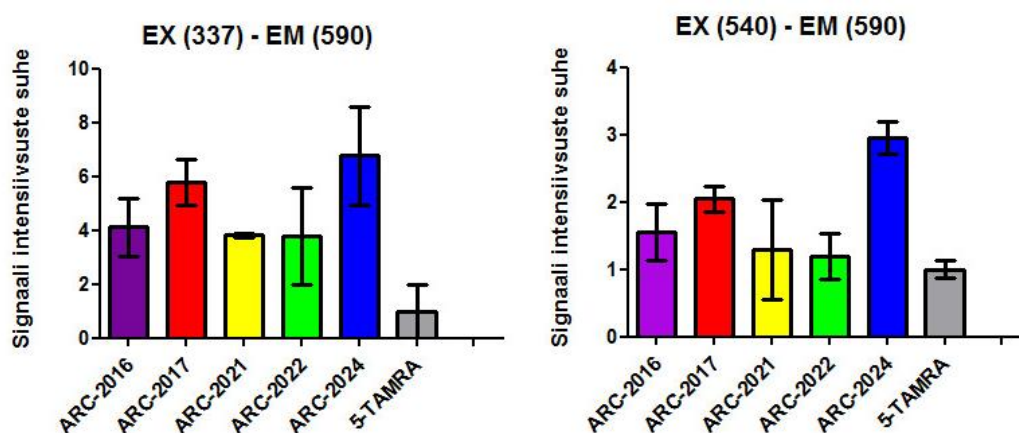


Graafik 1. FRET-i kiiruskonstandi sõltuvus proliinide arvust.

ARC-Lum(Fluo) sondide luminescentssignaali kustumist iseloomustav kiiruskonstant koosneb peamiselt kahest tegurist: doonorluminofoori fosforescentssignaali kustumise komponendist ning FRET-i komponendist doonorluminofoorilt aktseptorluminofoorile. FRET-ist tulenev kiiruskonstant on avaldatav $k_T = k_{DA} - k_D$, kus k_{DA} on ARC-Lum(Fluo) luminescentssignaali kiiruskonstant ning k_D ARC-Lum sondi luminescentssignaali kiiruskonstant. Kiiruskonstandid leiti pöördväärtusena luminescentssignaali eluigadest-lähendades, et tegemist on esimest järku protsessiga. k_D leidmiseks mõõdeti samades tingimustes proliini seeria ühenditega ARC-2006 fosforescentssignaali eluiga, mille mediaanväärtuseks saadi 13000 μ s (graafik toodud Lisa 4). Kirjanduses on määratud ühe proliinijäägi pikkus oligopoliinide ahelas (0,3 nm), kuid dipoolide kaugusele lisandub veel teatud distants muudest struktuuri elementidest. See distants hinnati ARC-2004 struktuuri põhjal, liites sidemepikkused oletatavate dipoolide vahel. Antud tulemusel liideti vastav proliinide arvust tulenev kauguse komponent, mis ühe proliinijäägi kohta oli 0,3 nm. Leitud FRET-i kiiruskonstantidele prooviti lähendada valemit $k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0^6}{r_{DA}^6} \right)$ (Graafik 1). Antud mudeljoon toob välja tendentsi, et mida suuremaks läheb distants doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori vahel, seda aeglasemalt toimub energia ülekanne. Analüüsi tulemusena saadi hinnanguliseks R_0 väärtuseks antud süsteemis $\sim 2,7$ nm. Kadri Ligi on arvutanud seleeni sisaldava fragmendi ja Cy3B süsteemi korral antud parameetri väärtuseks 2,6 nm. Neid arve ei saa üks-ühele võrrelda, kuna ARC-ide struktuurid erinevad küllaltki palju, kuid saadud tulemus on sarnane. Täpsemaks analüüsiks peaks uurima veel pikema proliinide ahelaga ARC-Lum(Fluo) sonde, kus energia ülekanne oleks vähem efektiivne, ja konstrueerima uut tüüpi ühendite seeriaid. Samuti võib proovida kustumiskõveraid alalüüsida keerukamate matemaatiliste funktsioonidega, mis võtavad arvesse orientatsioonifaktorite varieeruvust [32].

Mõõtes luminescentssignaali viivitusajaga, eiratakse kiireid protsesse, mis toimuvad 50 μ s jooksul. See parandab küll signaal-müra suhet, kuid kaotab ka olulist infot kiiremate protsesside korral. Lühemate doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori distantide korral võib toimuda suurema tõenäosusega singlett-singlett FRET, mis vähendab paralleelselt toimuva süsteemide vahelise ülemineku osakaalu. Selle tulemusena tekib vähem pika elueaga luminescentssignaali andvat tripletes olekut, millele viitab lühemate ainete väiksem luminescentssignaali algintensiivsus võrreldes triplett-singlett FRET-iga. Singlett-singlett FRET-i toimumise näitlikustamiseks kasutati viivitusajata statsionaarsetes tingimustes fluorestsentsintensiivsuse mõõtmist, kus ergastati aineid kahel erineval lainepikkusel: 337 nm ja 554 nm, mis vastavad tiofeeni sisaldava fragmendi ja 5-TAMRA neeldumistele ning

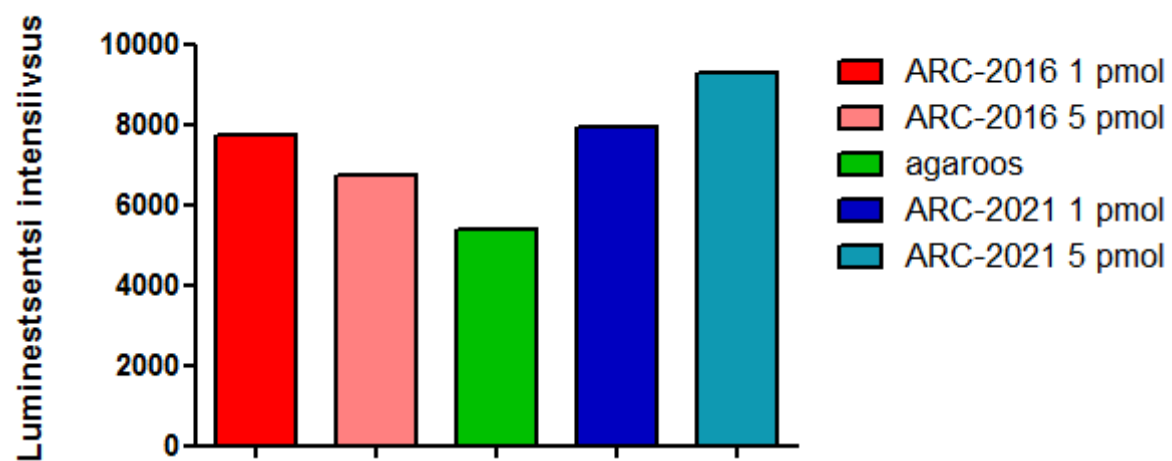
mõõdeti 5-TAMRA kiirgust 590 nm juures. Joonis 15 koostamisel lahutati ARC-ide fluorestsentssignaalide intensiivsustest puhvrist tulenev signaal ning seejärel jagati saadud väärtused normeerimiseks 5-TAMRA-kemtiidi signaalidega. Esimesel juhul ergastati eelkõige väävlit sisaldavat aromaatsset struktuuriosa (5-TAMRA neeldumine antud lainepikkusel on suhteliselt väike), millelt FRET mehhanismi tõttu läks energia 5-TAMRA-le ning teisel juhul ergastati otse 5-TAMRA-t. Mõlema süsteemi korral mõõdeti fluorestsentsvärvi relakseerumisel kiirguvat valguskiirgust. Võrreldes kahte graafikut on näha, et vasakpoolsel on ARC-ide signaalide intensiivsused võrreldes 5-TAMRA-kemtiidiga suuremad kui paremal oleval graafikul. Kuna mõõdeti 5-TAMRA relakseerumisel tekkinud fluorestsentskiirgust, mis normeeriti ainult 5-TAMRA-t sisaldava aine signaali intensiivsustega, viitab intensiivsuste muutumine FRET üleminekule 337 nm juures ergastatud väävlit sisaldavalt fragmendilt singlett-singlett ülekandega 5-TAMRA-le. Antud tingimuste juures on tripletsed olekud ebastabiilsed ja neist lähtuvaid komponente signaalis praktiliselt ei ole.



Joonis 15. Singlett-singlett FRET mehhanismi tõestamine ARC-Lum-Fluo sondides. 5-TAMRA-ga on joonisel tähistatud 5-TAMRA-kemtiidi.

4.2.4 ARC-id agarosis

Kuna PVA andis mõõdetava luminesentssignaali, tekkis huvi proovida veel mõnda polümeerset maatriksit, milleks valiti agaros. Katse teostati sarnaselt PVA katsetele, kuid selgus, et luminesentssignaali ei tekkinud (Joonis 16) ning seetõttu ei saa agarosi antud meetodi puhul maatriksina kasutada.



Joonis 16. ARC-id agarooosi maatriksis.

5 Kokkuvõte

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida kinnitust oletusele, et ARC-Lum(Fluo) sondide korral toimuv energia üleminek on FRET tüüpi. Selleks sünteesiti erineva doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori vahelise kaugusega ARC-Lum(Fluo) sonde ning määrati nende luminescentssignaali eluigad.

Teoreetilises osas kirjeldati fotoluminesentsi ning selle erinevaid liike, kusjuures erilist tähelepanu pöörati toatemperatuursele fosforesentsile. Tehti ülevaade ARC-Lum ja ARC-Lum(Fluo) sondidest, toodi välja Försteri resonantsenergia ülemineku olemus ning selle seos ARC-Lum(Fluo) sondidega. Kirjeldati tahkefaasi peptidisünteesi, mida kasutati ARC-tüüpi ühendite sünteesil. Samuti kirjeldati põgusalt proteiinkinaase ning nende inhibiitoreid.

Töö eksperimentaalses osas sünteesiti 23 uut ARC-tüüpi ühendit ning määrati 11-ne ARC-Lum(Fluo) sondi luminescentssignaali eluead – neist viie määramisel kasutati uudet meetodit, milleks oli ARC-ide dopeerimine PVA-sse. See võimaldas mõõta pika elueaga luminescentssignaali sondidele, mis ei olnud PKAc suhtes affiinsed. Dopeerimisel PVA-sse kaitses polümeer ergastatud tripletset olekut kustutavate mõjude eest. Varasemalt on ARC-ide korral tripletse oleku stabiliseerimine saavutatud proteiinkinaasidega komplekseerumisel, mida kasutati ka antud töös. ARC-2003 kuni ARC-2005 keskmisteks luminescentssignaali eluigadeks PKAc kompleksis mõõdeti vastavalt 79; 104 ja 109 μ s, mis olid sõltuvuses linkeri pikkusest. ARC-2009 kuni ARC-2011 keskmistatud luminescentssignaali eluigadeks mõõdeti 58; 88 ja 85 μ s. Teises seerias esinevat anomaaliat doonorluminofoori ja aktseptorluminofoori kauguse suurenemise ning luminescentssignaali eluea vähenemise vahel põhjendati molekuli struktuuri painduvusega kompleksis PKAc-ga. Selle takistuse ületamiseks sünteesiti seeria, mille korral oli linkerina kasutatud jäiksid oligoprolaine ning nende ühendite luminescentssignaali eluea määramiseks kasutati dopeerimist PVA-sse. Keskmistatud luminescentssignaali eluead proliinijääkide suurenemisel olid vastavalt: 98; 274; 429; 628 ja 1058 μ s. Antud andmete põhjal teostati ka arvutused Försteri distantse leidmiseks ning selleks määrati 2,7 nm. Eelnevalt on uurimisgrupis ARC-Lum(Fluo) sondides saadud R_0 arvutuslikuks väärtuseks 2,6 nm.

Försteri raadiuse kindlaks tegemine aitab kaasa ARC-Lum(Fluo) sondide disainimisele, kuna teades Försteri distantse doonorluminofoori ning aktseptorluminofoori vahel, on lihtsam paika panna nendevahelise linkeri pikkust, et valmistada optimaalsemate omadustega sonde

erinevateks rakendusteks. Edasisteks plaanideks on uue mõõtmistehnika optimeerimine ning FRET tüüpi ülemineku põhjalikum uurimine.

SYNTHESIS OF MODEL COMPOUNDS FOR THE STUDY OF THE FÖRSTER DISTANCE IN ARC-LUM(FLUO) PROBES.

Joana Jögela

6 Summary

The aim of this study was to confirm the assumption that FRET type energy transfer happens in the ARC-Lum(Fluo) probes. In order to achieve that, new ARC-Lum(Fluo) probes with varied distance between donor luminophore and acceptor luminophore were synthesized and the lifetime of the luminescence signal were measured.

The theoretical part of this thesis describes different types of photoluminescence, special attention was paid to room-temperature phosphorescence. In addition to that, an overview about ARC-Lum and ARC-Lum(Fluo) probes and the essence of the Förster resonance energy were given and its connection with ARC-Lum(Fluo) probes. The theoretical part also described the solid phase peptide synthesis, which was used for synthesizing new compounds and presented a short overview of protein kinases and their inhibitors.

In the experimental part of this study 23 new ARC-type compounds were synthesized and determined the lifetime of the luminescence signal of 11 ARC-Lum(Fluo) probes. For 5 of them, a new method of doping PVA with probes was used. This method allowed the measurement of the long lifetime luminescence signal with probes which were not affine enough in relation with PKAc. When doping probes into PVA, the polymer protects the triplet state of the probes from decay. Also the method of stabilization of the triplet state of ARC-Lum probes with protein kinase complexes was used. The average lifetimes of the compounds ARC-2003 – ARC-2005 were measured as following: 79; 104 and 109 μ s, which showed the dependence between the luminescence signal lifetime and the length of the linker. The average lifetimes of the compounds ARC-2009 – ARC-2011 were measured as 58; 88 and 85 μ s. The anomaly of the increase of the distance between the donor luminophore and acceptor luminophore and the decrease of the lifetime of the luminescence signal was explained with the flexibility of the molecule while binding to PKAc. Series of probes were synthesized, where oligoprolines were used as the linker and the luminescence signal lifetime of the probes were measured in PVA matrix. When increasing the number of prolines in the linker, the average luminescence lifetime for these probes were 98; 274; 429; 628 and 1058 μ s. Calculation of Förster's radius was done on the basis of these ARC-Lum(Fluo) probes. The calculations gave the following result: R_0 being 2.7 nm. Previously, the calculations in our workgroup has given the result such as R_0 being 2.6 nm.

Determining the Förster distance will improve designing new ARC-Lum(Fluo) probes, because it is more easier to choose the length of the linker which is used between donor luminophore and acceptor luminophore. Having the right distance between donor and acceptor will let us use new probes in luminescence analysis. The plans for the future are to optimize the measurement of the new technique and achieve more thorough research of the FRET type energy transfer.

7 Kasutatud kirjandus

1. Enkvist, E., Vaasa, A., Kasari, M., Kriisa, M., Ivan, T., Ligi, K., Raidaru, G., Uri, A., Protein-induced long lifetime luminescence of nonmetal probes, *ACS Chem Biol*, **2011**, 6, 1052–1062
2. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, USA, **2006**
3. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Edition, Cengage Learning, **2013**
4. Medintz, I., Hildebrandt, N., FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications, Wiley-VCH, Germany, **2014**
5. Lundin, K., Blomberg, K., Nordström, T., Lindqvist, C., Development of a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay (cell TR-FRET) for protein detection on intact cells, *Anal Biochem*, **2001**, 299, 92–97
6. Sauer, M., Hofkens, J., Enderlein, J., Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules, Wiley-VCH, Germany, **2011**
7. Kwan, J., Ling, A., Papp, E., Shaw, D., Bradshaw, J.M., A fluorescence resonance energy transfer-based binding assay for characterizing kinase inhibitors: important role for C-terminal biotin tagging of the kinase, *Anal Biochem*, **2009**, 395, 256–262
8. Riddle, M. S., Vedvik, K. L., Hanson, G. T., Vogel, K. W., Time-resolved fluorescence resonance energy transfer kinase assays using physiological protein substrates: Applications of terbium–fluorescein and terbium–green fluorescent protein fluorescence resonance energy transfer pairs, *Anal Biochem*, **2006**, 356, 108–116
9. Kuijt, J., Ariese, F., Brinkman, U.A.Th., Gooijer, C., Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry, *Anal Chim Acta*, **2003**, 488, 135–171
10. Kwon, M.S., Lee, D., Seo, S., Jung, J., Kim, J., Tailoring Intermolecular Interactions for Efficient Room-Temperature Phosphorescence from Purely Organic Materials in Amorphous Polymer Matrices, *Angew Chem Int Ed*, **2014**, 53, 11177–11181
11. Baumann, R.P., Penketh, P.G., Seow, H.A., Shyam, K., Sartorelli, A.C., Generation of Oxygen Deficiency in Cell Culture Using a Two-Enzyme System to Evaluate Agents Targeting Hypoxic Tumor Cells, *Radiat Res*, **2008**, 170, 651–660

12. Ceborska, M., Asztemborska, M., Luboradzki, R., Lipkowski, J., Interactions with β -cyclodextrin as a way for encapsulation and separation of camphene and fenchene, *Carbohydr Polym*, **2013**, 91, 110–114
13. Ribeiro, L., Carvalho, R.A., Ferreira, D.C., Veiga, F.J., Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies, *Eur J Pharm Sci*, **2005**, 24, 1–13
14. Lavogina, D., Enkvist, E., Uri, A., Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to practical applications, *ChemMedChem*, **2010**, 5, 23–34. Review
15. Kasari, M., Ligi, K., Williams, J.A., Vaasa, A., Enkvist, E., Viht, K., Pålsson, L.O., Uri, A., Responsive microsecond-lifetime photoluminescent probes for analysis of protein kinases and their inhibitors, *Biochim Biophys Acta*, **2013**, 1834, 1330–1335
16. Ekambaram, R., Enkvist, E., Manoharan, Gb., Ugandi, M., Kasari, M., Viht, K., Knapp, S., Issinger, O.-G., Uri, A., Benzosenadiazole-based responsive long-lifetime photoluminescent probes for protein kinases, *Chem Commun*, **2014**, 50, 4096–4098
17. Hodgson, D., Scröder, M., Chemical approaches towards unravelling kinase-mediated signalling pathways, *Chem Soc Rev*. **2010**, 40, 1211–1223
18. Pearce, L. R., Komander, D., Alessi, D. R., The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2010**, 11, 9–22. Review.
19. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome, *Sci*, **2002**, 298, 1912–1934. Review
20. Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor S.S., Sowadski, J.M., Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Sci*, **1991**, 253, 407–414
21. Ricouart, A., Gesquiere, J.C., Tartar, A., Sergheraert, C., Design of potent protein kinases inhibitors using the bisubstrate approach, *J Med Chem*, **1991**, 34, 73–78
22. Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, 5th Edition, W. H. Freeman, New York, **2005**
23. Chan W.C., White P.D., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, **2010**

24. Wilhelm, R. R., Srinivasan, A., Schmidt, M. A., Evaluation of ivDde as a quasi-orthogonal protecting group for Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Peptides for the New Millennium*, **2000**
25. Isidro-Llobet, A., A'lvarez, M., Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2455–2504
26. Engh, R.A., Girod, A., Kinzel, V., Huber, R., Bossemeyer, D. Crystal Structures of Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in Complex with soquinolinesulfonyl Protein Kinase Inhibitors H7, H8, and H89, *J Biol Chem*, **1996**, 271, 26157–26164
27. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal Biochem*, **1970**, 34, 595–598
28. Nishioka, T., Yuan, J., Yamamoto, Y., Sumitomo, K., Wang, Z., Hashino, K., Hosoya, C., Ikawa, K., Wang, G., Matsumoto, K., New Luminescent Europium(III) Chelates for DNA Labeling, *Inorg Chem*, **2006**, 45, 4088–4096
29. Schuler, B., Lipman, E.A., Steinbach, P.J., Kumke, M., Eaton, W.A., Polyproline and the “spectroscopic ruler” revisited with single-molecule fluorescence, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, 102, 2754–2759
30. Wilhelm, P., Lewandowski, B., Trapp, N., Wennemers, H., A crystal structure of an oligoproline PPII-helix, at last, *J Am Chem Soc*, **2014**, 136, 15829–15832
31. Stryer, L., Haugland, R.P., Energy transfer: a spectroscopic ruler, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1967**, 58, 719–726
32. Hirschfeld, V., Paulsen, H., Hübner, C.G., The spectroscopic ruler revisited at 77 K, *Phys Chem Chem Phys*, **2013**, 15, 17664–17671

8 Lisad

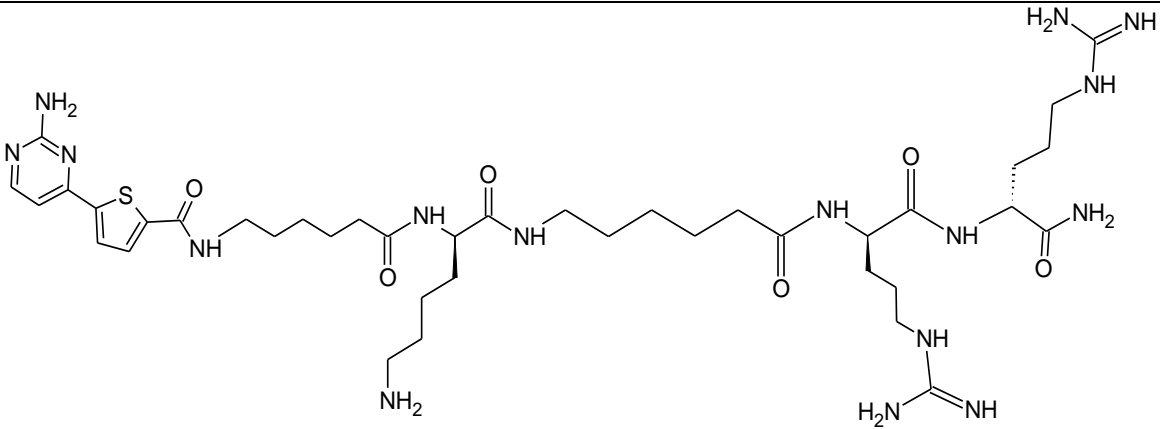
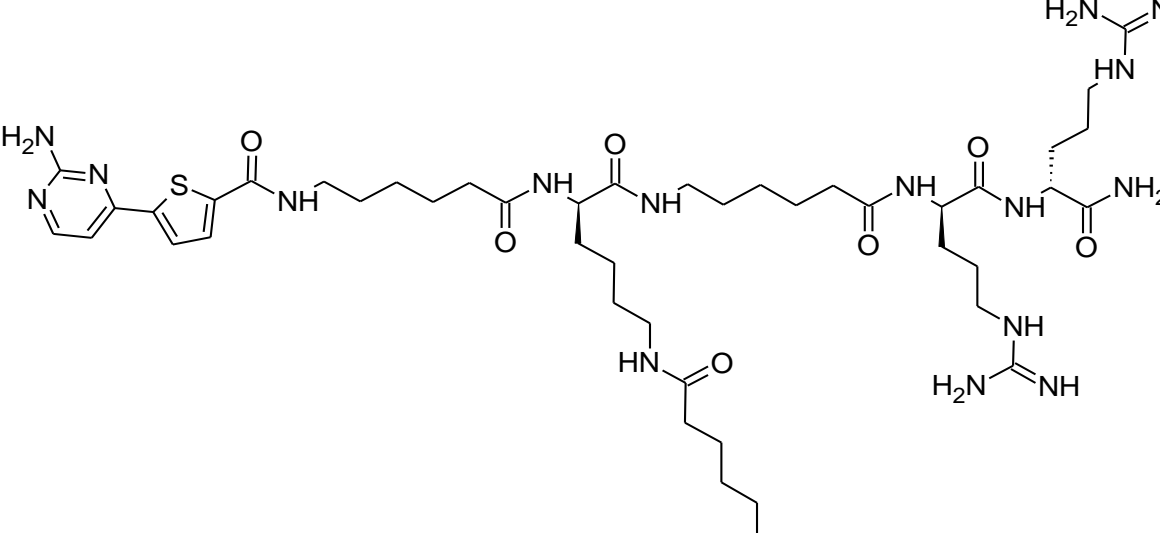
Lisa 1. ARC- tüüpi inhibiitorite struktuurid koos koodidega

Lisa 2. Prolüini heeliksi struktuur

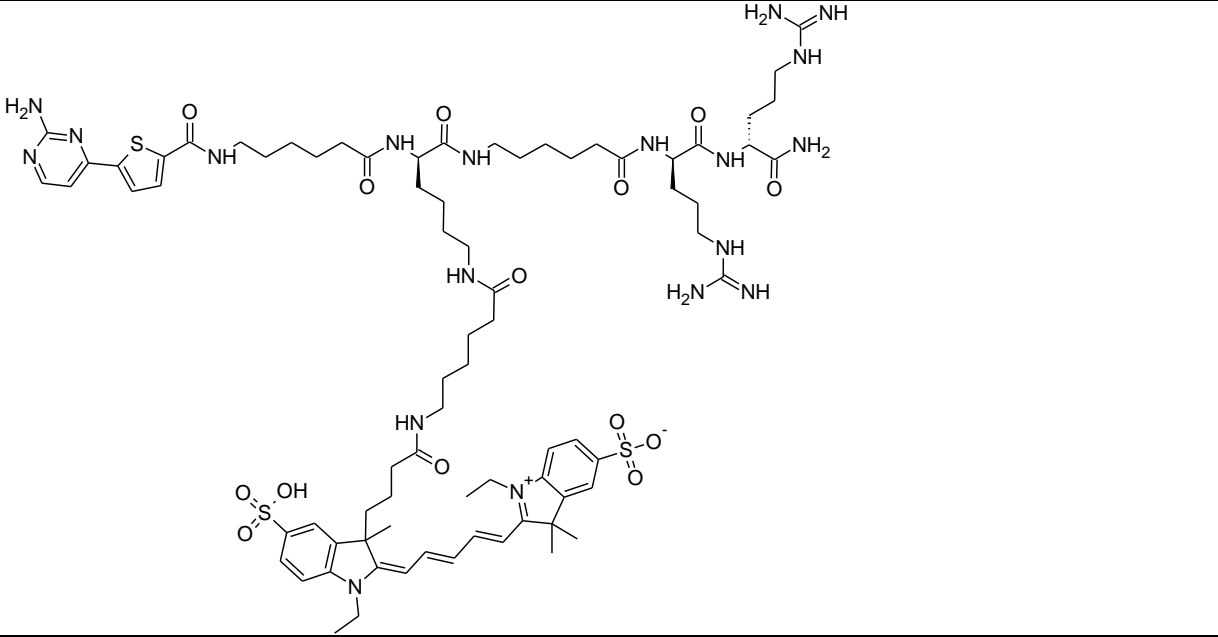
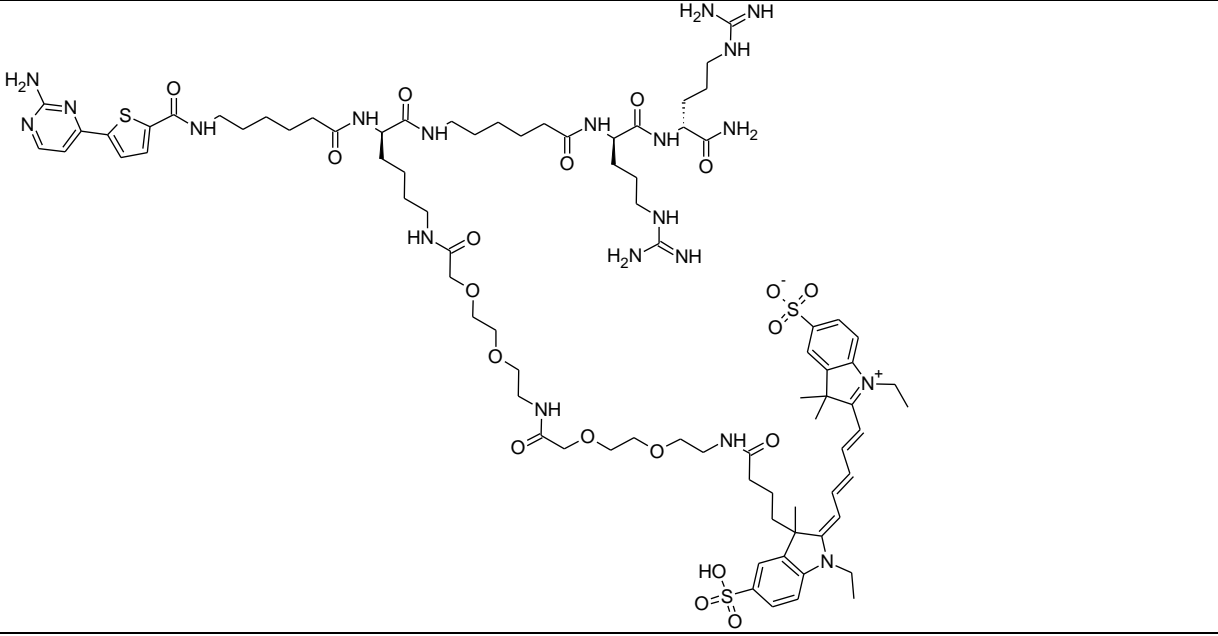
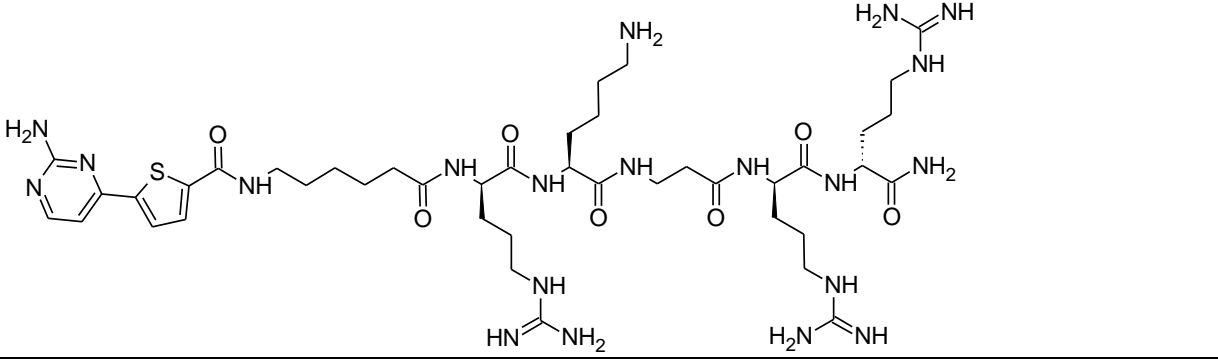
Lisa 3. ARC-2003 kuni ARC-2005 ja ARC-2009 kuni ARC-2011 sidumiskõverad

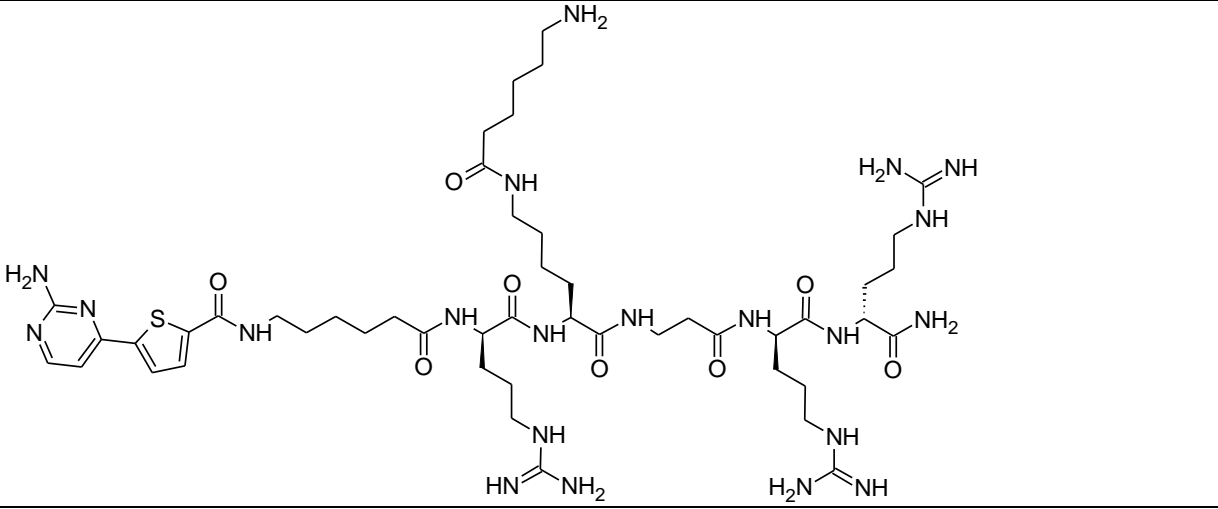
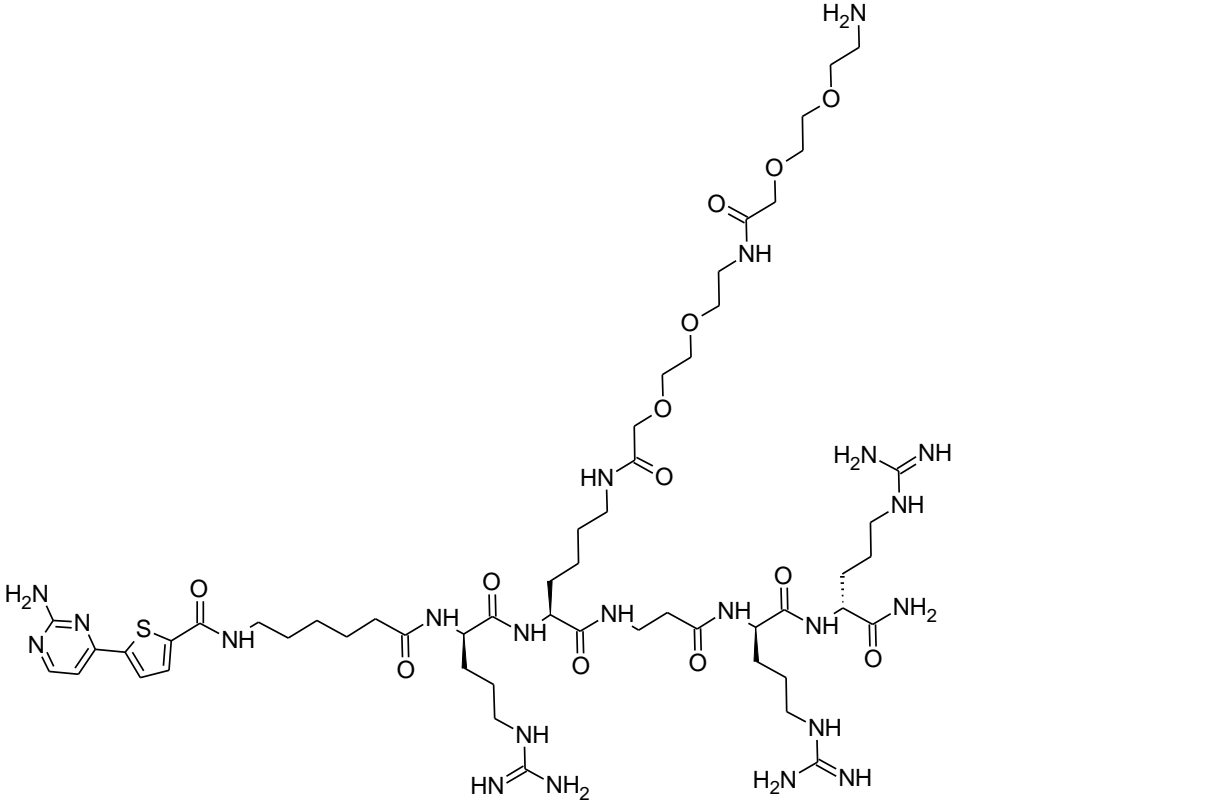
Lisa 4. ARC-2006 luminescentssignaali eluiga

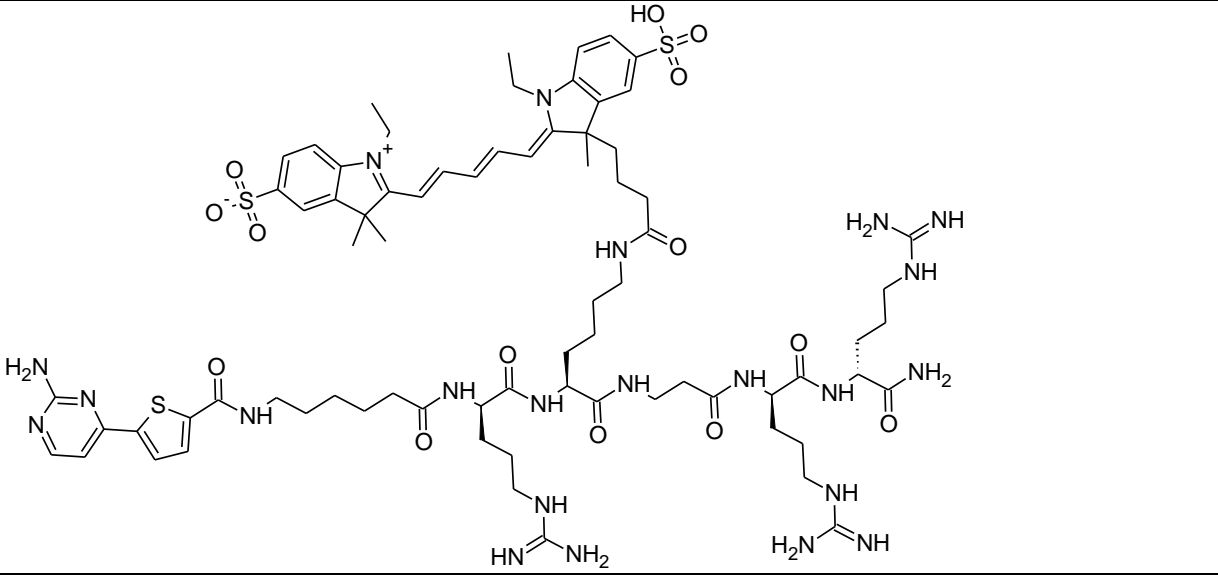
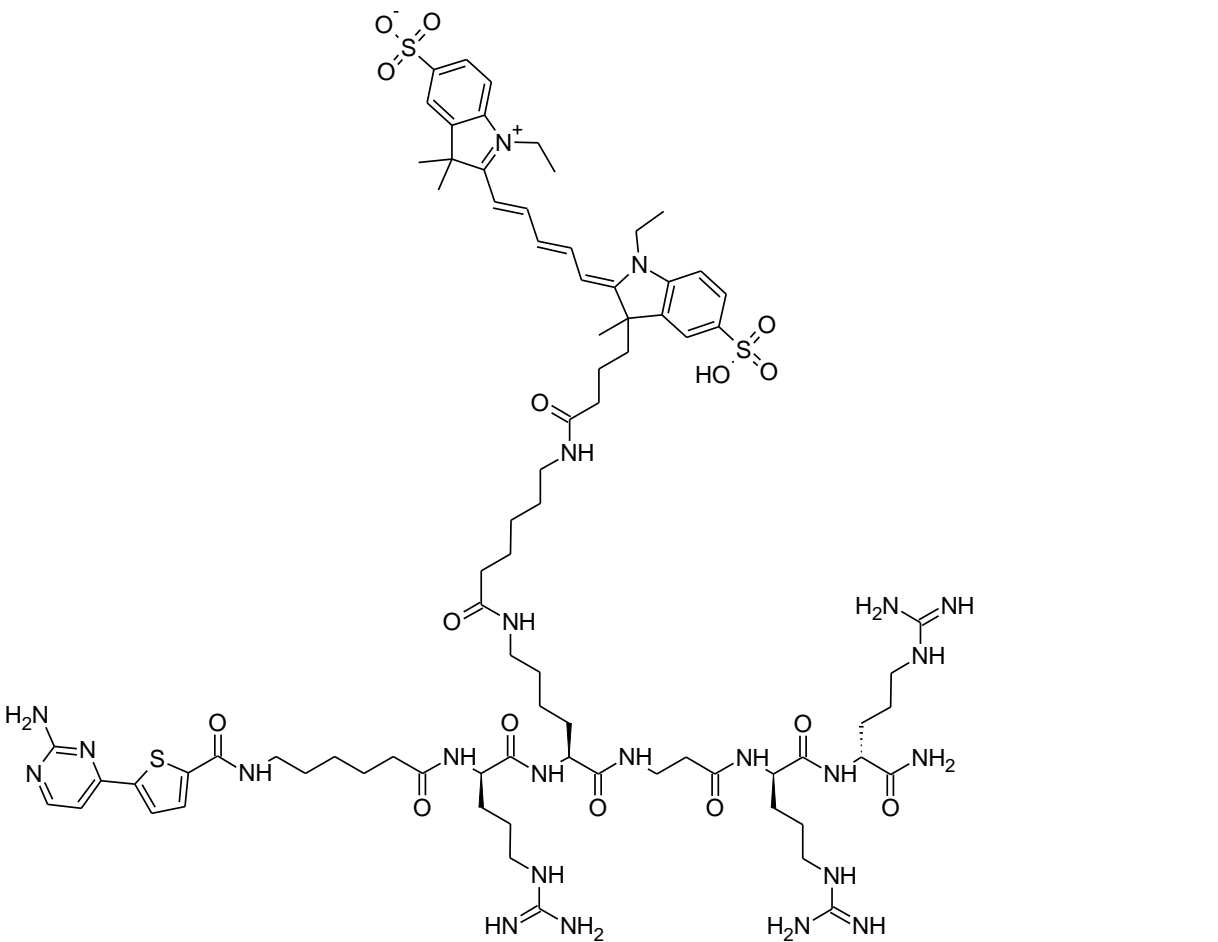
Lisa 1. ARC- tüüpi inhibiitorite struktuurid koos koodidega

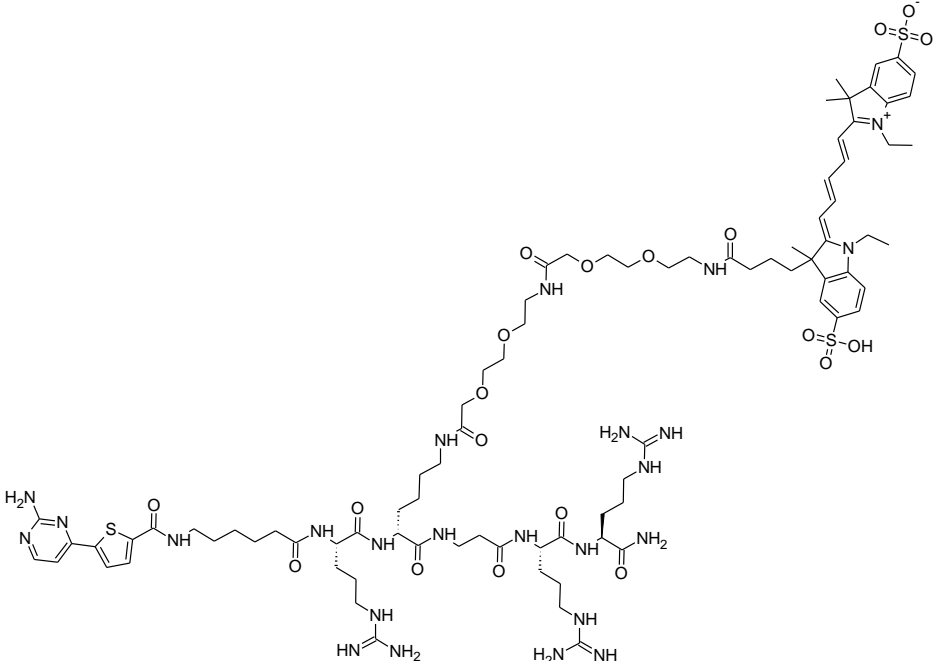
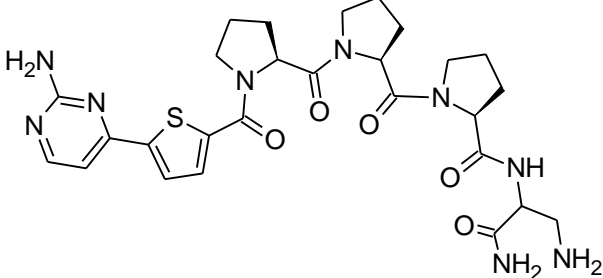
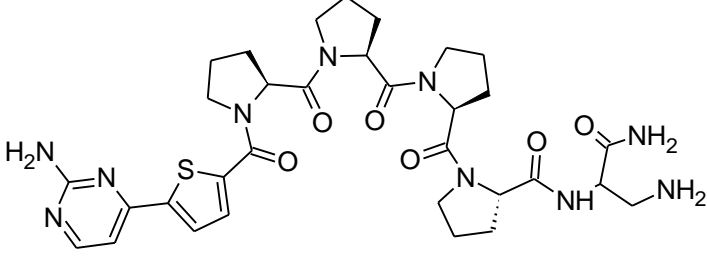
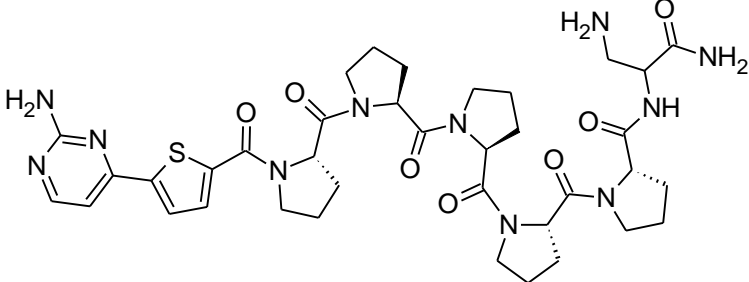
Kood	Struktuur
ARC-2000	 <p>The chemical structure of ARC-2000 is a complex molecule featuring a thienopyrimidine core. The thienopyrimidine ring is substituted with an amide group (-NH-) which is part of a long, flexible chain. This chain contains several amide linkages and is terminated by a guanidino group (-NH-C(=NH)-NH₂). The structure is shown in a perspective view, with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>
ARC-2001	 <p>The chemical structure of ARC-2001 is a complex molecule featuring a thienopyrimidine core. The thienopyrimidine ring is substituted with an amide group (-NH-) which is part of a long, flexible chain. This chain contains several amide linkages and is terminated by a guanidino group (-NH-C(=NH)-NH₂). The structure is shown in a perspective view, with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>

[illegible]

ARC-2004	 <p>The chemical structure of ARC-2004 is a complex molecule. It features a central chain of amide bonds. On the left, there is a thienopyrimidine moiety. The chain includes several side chains, including a long alkyl chain, a guanidino group, and a complex side chain containing a sulfonamide group and a sulfonate group. The molecule is highly branched and contains multiple functional groups.</p>
ARC-2005	 <p>The chemical structure of ARC-2005 is a complex molecule. It features a central chain of amide bonds. On the left, there is a thienopyrimidine moiety. The chain includes several side chains, including a long alkyl chain, a guanidino group, and a complex side chain containing a sulfonamide group and a sulfonate group. The molecule is highly branched and contains multiple functional groups.</p>
ARC-2006	 <p>The chemical structure of ARC-2006 is a complex molecule. It features a central chain of amide bonds. On the left, there is a thienopyrimidine moiety. The chain includes several side chains, including a long alkyl chain, a guanidino group, and a complex side chain containing a sulfonamide group and a sulfonate group. The molecule is highly branched and contains multiple functional groups.</p>

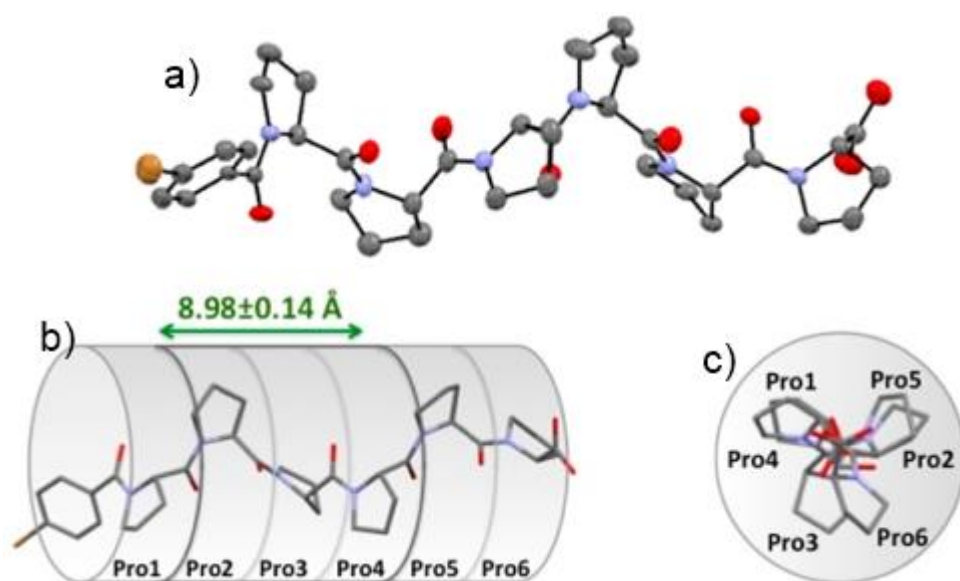
<p>ARC-2007</p>	 <p>The chemical structure of ARC-2007 is a complex molecule. It features a 4-amino-2-pyrimidinylthiophene group at the left end, which is linked via an amide bond to a long aliphatic chain. This chain contains several amide and urea linkages, including a central urea bridge. The molecule is terminated at the right end with a guanidino group. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds at the chiral centers.</p>
<p>ARC-2008</p>	 <p>The chemical structure of ARC-2008 is similar to ARC-2007 but includes a long, flexible polyether side chain. This side chain is attached to the central part of the molecule and contains multiple ether linkages and a terminal primary amine group. The rest of the molecule, including the thiophene-pyrimidine core and the guanidino-terminated aliphatic chain, is identical to ARC-2007. Stereochemistry is also indicated with wedged and dashed bonds.</p>

<p>ARC-2009</p>	 <p>The chemical structure of ARC-2009 is a complex molecule. It features a central peptide backbone with several modifications. On the left, there is a thiazole ring substituted with a pyrimidine-2-yl group. The backbone includes several amide bonds and side chains, including a long alkyl chain, a guanidino group, and a sulfonamide group. The molecule is terminated with a guanidino group on the right and a sulfonamide group on the left.</p>
<p>ARC-2010</p>	 <p>The chemical structure of ARC-2010 is a complex molecule, similar to ARC-2009 but with distinct differences. It features a central peptide backbone with several modifications. On the left, there is a thiazole ring substituted with a pyrimidine-2-yl group. The backbone includes several amide bonds and side chains, including a long alkyl chain, a guanidino group, and a sulfonamide group. The molecule is terminated with a guanidino group on the right and a sulfonamide group on the left.</p>

ARC-2011	
ARC-2013	
ARC-2014	
ARC-2015	

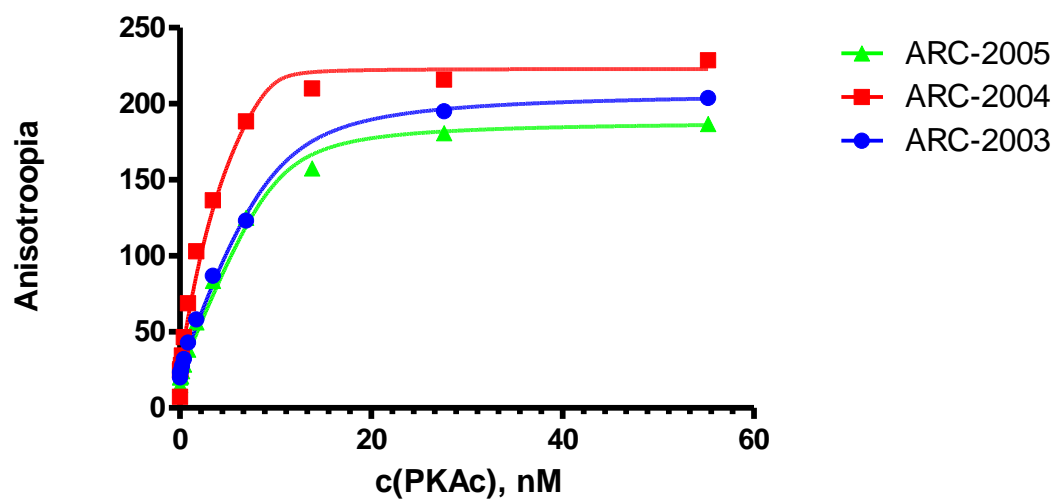
ARC-2016	
ARC-2017	
ARC-2019	
ARC-2020	
ARC-2021	

Lisa 2. Prolüini heeliks

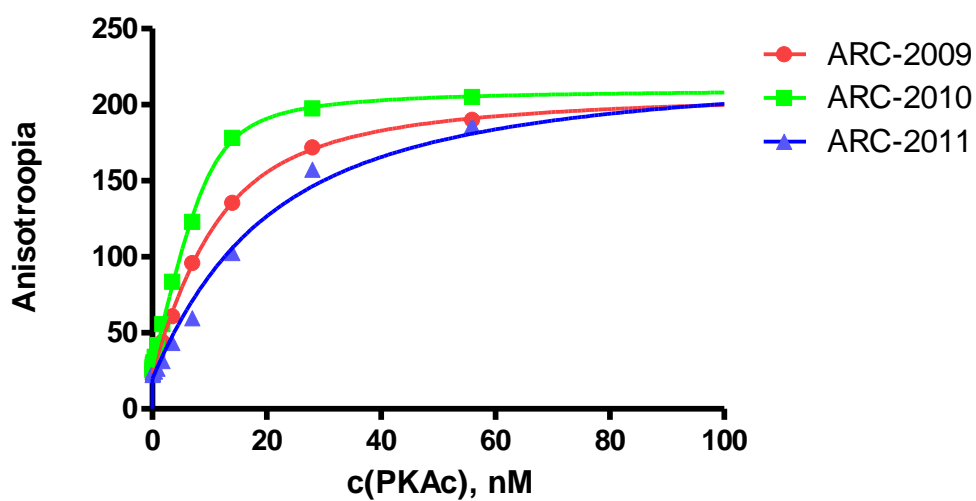


a) proliini heeliksi ruumiline struktuur, b) proliini heeliksi pikkus ja c) ristlõikes heeliks. Joonis on muudetud, kuid kasutatud Wilhelm, P., Lewandowski, B., Trapp, N., Wennemers, H., A crystal structure of an oligoproline PPII-helix, at last, *J Am Chem Soc*, **2014**, 136, 15829-15832 illustratsiooni.

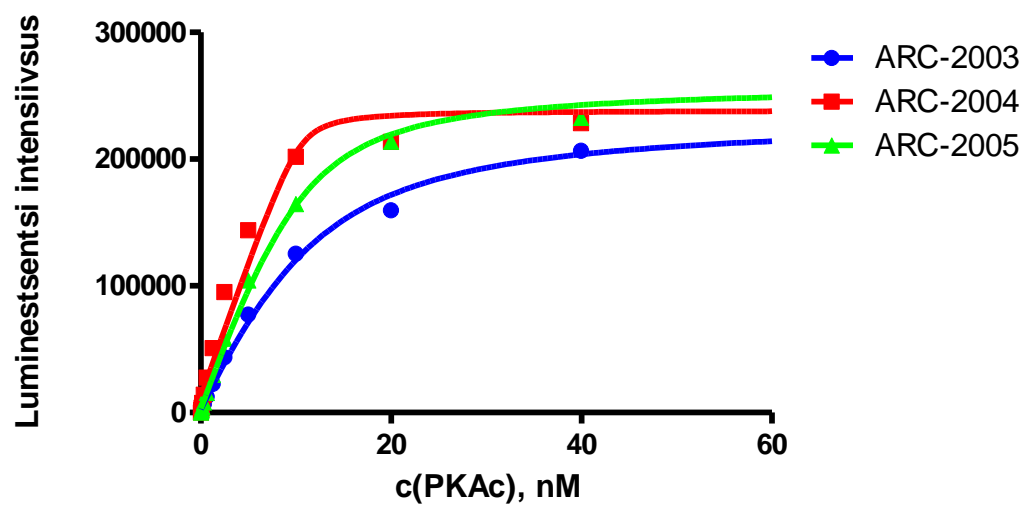
Lisa 3. ARC-2003 kuni ARC-2005 ja ARC-2009 kuni ARC-2011 sidumiskõverad



ARC-2003 kuni ARC-2005 K_d väärtused on 1...5 nM. Võrdlusainena kasutati 5 nM ARC-1182.

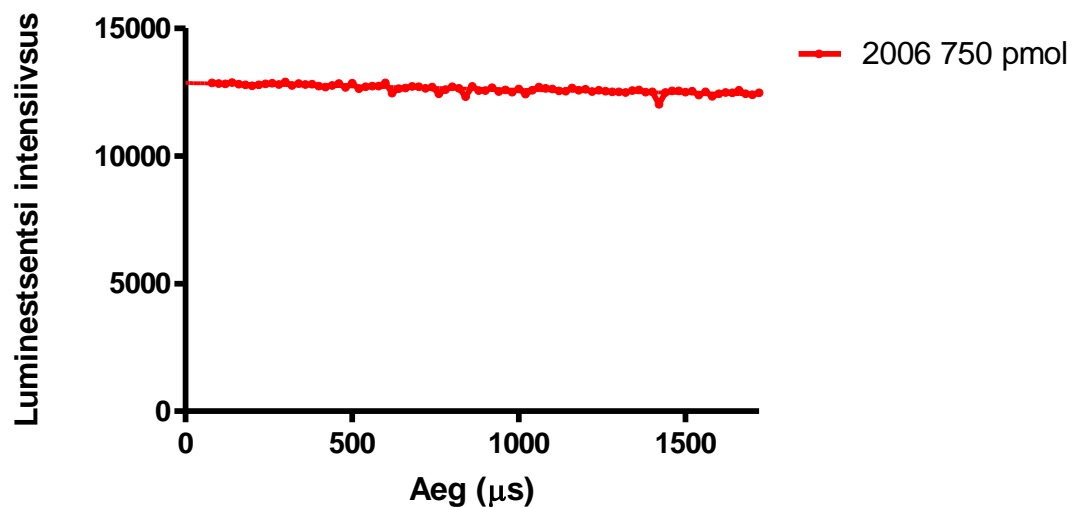


ARC-2009 kuni ARC-2011 K_d väärtused on alla 10 nM. Võrdlusainena kasutati 10 nM ARC-1182.



Komplekseerumisel mõõdetud luminestsentssignaali intensiivsuse graafik, et tuua välja intensiivsuste suurusjärk, kui on tekkinud kompleks ARC-i ja PKAc vahel.

Lisa 4. ARC-2006 luminescentssignaali kustumise kõver



Mikrotiiterplaadilugejat PHERAstar on võimalik mõõta luminescentssignaali eluiga kuni 1720 μs . Nagu ülalolevalt graafikult näha, siis selle aja jooksul ei toimu oluliselt luminescentssignaali kustumist. Seetõttu on ka antud ühendi luminescentssignaali eluea määramine küllaltki suure mõõtemääramatusega.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Joana Jõgela (sünnikuupäev: 04.11.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**MUDELAINETE SÜNTEES FÖRSTERI DISTANTSI UURIMISEKS ARC-
LUM(FLUO) SONDIDES,**

mille juhendajad on Erki Enkvist, Jürgen Vahter

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni 01.01.2018.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2015**